

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

Einfluss der Entstehung und der Therapie
von Epilepsien auf die Blut-Hirn-Schranke:
Untersuchungen zur Regulation
von ABC-Transportern und
differentielle Proteomanalysen

von Anna Katharina Kistler

aus München

München 2016

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von:
Univ.-Prof. Dr. Heidrun Potschka

Mitbetreuung durch:
Dr. Eva-Lotta von Rüden, Ph.D. und
Josephine Salvamoser

**Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Heidrun Potschka

Korreferent/en: Prof. Dr. Andrea Fischer

Tag der Promotion: 16. Juli 2016

Für meine Familie

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG	12
II.	LITERATURÜBERSICHT	14
1.	Epilepsie	14
1.1.	Definition.....	14
1.2.	Klassifizierung.....	15
1.3.	Epileptogenese.....	16
2.	Blut-Hirn-Schranke.....	18
3.	ABC-Transporter	21
3.1.	P-Glykoprotein	22
3.2.	<i>Breast cancer resistance protein</i>	24
3.3.	<i>Multidrug resistance-associated protein 2</i>	25
4.	Pharmakoresistente Epilepsie	27
4.1.	<i>Target</i> -Hypothese	28
4.2.	Transporter-Hypothese	29
4.3.	<i>Intrinsic-severity</i> -Hypothese.....	32
4.4.	Strategien zur Überwindung der Pharmakoresistenz.....	33
5.	Antiepileptika.....	35
5.1.	Phenobarbital	36
5.2.	Carbamazepin	36
5.3.	Topiramat.....	37
6.	Proteomik.....	38
6.1.	Neuroproteomik.....	38
7.	Angiogenese im Gehirn.....	40
III.	ARBEITSHYPOTHESEN UND ZIELSETZUNG	44
1.	Regulation von ABC-Transportern durch Antiepileptika	44
2.	Proteomanalysen Blut-Hirn-Schranken-assoziiierter Proteine während der Epileptogenese	46
IV.	MATERIAL UND METHODEN	48
1.	Regulation von ABC-Transportern durch Antiepileptika	48

1.1.	Kapillarisolation	48
1.2.	Transport-Assay.....	50
1.3.	Western Blot	56
1.4.	Statistik	59
2.	Proteomanalysen Blut-Hirn-Schranken-assoziiierter Proteine während der Epileptogenese	60
2.1.	Versuchsdesign	60
2.2.	Durchführung der differentiellen Proteomanalyse	61
2.2.1.	Gewebeaufbereitung und massenspektrometrische Analyse	61
2.3.	Datenanalysen zur Identifizierung Blut-Hirn-Schranken-assoziiierter Proteine im Verlauf der Epileptogenese	62
2.3.1.	<i>Pathway</i> -Enrichment-Analyse	62
2.3.2.	Weiterführende Recherche.....	63
2.3.3.	Proteinexpressionsanalysen	63
2.4.	Immunhistochemie	64
2.4.1.	Immunhistochemische Färbemethoden	64
2.4.2.	Gewebeaufbereitung	65
2.4.3.	Etablierung des immunhistochemischen Nachweises von <i>nucleolin</i>	65
V.	ERGEBNISSE	69
1.	Effekte der Antiepileptika auf die Transporter-Funktion und die - Expression im zeitlichen Verlauf	69
1.1.	Auswirkungen auf die Transportaktivität	69
1.1.1.	P-Glykoprotein.....	70
1.1.2.	<i>Breast cancer resistance protein</i>	73
1.1.3.	<i>Multidrug resistance-associated protein 2</i>	76
1.2.	Auswirkungen auf die Proteinexpression	79
1.2.1.	P-Glykoprotein.....	79
1.2.2.	<i>Breast cancer resistance protein</i>	80
2.	Proteomanalysen Blut-Hirn-Schranken-assoziiierter Proteine während der Epileptogenese	81
2.1.	Blut-Hirn-Schranken-assoziierte <i>pathways</i>	81
2.1.1.	Wachstumsfaktoren-assoziierte <i>pathways</i>	82
2.1.2.	ABC-Transporter-assoziierte <i>pathways</i>	85

2.2.	Selektion und individuelle Expression Blut-Hirn-Schranken-assoziiierter Proteine	87
2.2.1.	Wachstumsfaktoren-assoziierte Proteine	87
2.2.2.	ABC-Transporter-assoziierte Proteine	95
2.2.3.	Tight Junction-assoziierte Proteine	99
2.3.	Immunhistochemische Validierung von <i>nucleolin</i>	102
VI.	DISKUSSION	104
1.	Regulation von ABC-Transportern durch Antiepileptika	104
2.	Modulation Blut-Hirn-Schranken-assoziiierter <i>pathways</i> und Proteine während der Epileptogenese.....	115
VII.	ZUSAMMENFASSUNG	129
VIII.	SUMMARY	131
IX.	LITERATURVERZEICHNIS	133
X.	ANHANG	164
1.	Substanzen	164
2.	Antikörper.....	168
3.	Lösungen und Puffer.....	169
3.1.	Transport-Assay und Western Blot	169
3.2.	Immunhistochemie	171
4.	Geräte	175
5.	Software.....	177
6.	R-Skript.....	178
XI.	DANKSAGUNG.....	179

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ABC	<i>ATP-binding cassette</i>
ABCA1	<i>ATP-binding cassette sub-family A member 1</i>
ABCB1A; 1B; 7	<i>ATP-binding cassette sub-family B member 1A; 1B; 7</i>
ABCC	<i>ATP-binding cassette sub-family C</i>
ABCD3	<i>ATP-binding cassette sub-family D member 3</i>
ABCG1; 2; 4; 5; 8	<i>ATP-binding cassette sub-family G member 1; 2; 4; 5; 8</i>
ADAM17	<i>Disintegrin and Metalloproteinase domain-containing protein 17</i>
ADRBK1	<i>Beta-adrenergic receptor kinase 1</i>
AE	Antiepileptikum
AED	<i>Antiepileptic drug</i>
AKT	<i>Protein kinase B</i>
AMPA	Aminomethylphosphonsäure
ANXA1; 2; 4	<i>Annexin A1; 2; 4</i>
AP-1	<i>Activator protein 1</i>
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
ATP	Adenosintriphosphat
BCRP	<i>Breast cancer resistance protein</i>
BHS	Blut-Hirn-Schranke
BLA	Basolaterale Amygdala
BSA	Bovines Serumalbumin
CaCl ₂	Calciumchlorid
CAR	<i>Constitutive androstane receptor</i>
CBZ	Carbamazepin
CDC42	<i>Cell division cycle protein 42</i>
CETA	<i>Concentration equilibrium transport assay</i>
cGMP	Zyklisches Guanosinmonophosphat
CLDND1	<i>Claudin domain-containing protein 1</i>
COX-1	Zyklooxygenase-1
COX-2	Zyklooxygenase-2
CRK	<i>Adapter molecule crk</i>
DAB	Diaminobenzidin
DAG	Diacylglycerol
DDX6	<i>Probable ATP-dependent RNA helicase DDX6</i>
DNA	Deoxyribonucleic acid
DMSO	Dimethylsulfoxid
ECL	<i>Enhanced chemiluminescence</i>

EEG	Elektroenzephalografie
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
eNOS	<i>Endothelial nitric oxide synthase</i>
ESAM	<i>Endothelial cell-selective adhesion molecule</i>
EZR	<i>Ezrin</i>
FASP	<i>Filter aided sample preparation</i>
FTC	Fumitremorgin C
FXR	<i>Farnesoid X receptor</i>
GABA	γ -Aminobuttersäure
GABA _A -Rezeptor	γ -Aminobuttersäurerezeptor des Typs A
GDP	Guanosindiphosphat
GM-CSF	<i>Granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>
GRB2	<i>Growth factor receptor-bound protein 2</i>
GTP	Guanosintriphosphat
GUCY1B3	<i>Guanylate cyclase 1, soluble, beta 3</i>
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HCL	Chlorwasserstoff
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure
HIF1A	<i>Hypoxia-inducible factor 1 α</i>
HIV	Humane Immundefizienz-Virus
HRAS	<i>GTPase HRas</i>
HRP	Meerrettich-Peroxidase
HSF1	<i>Heat shock transkription factor 1</i>
IBE	<i>International Bureau for Epilepsy</i>
IFN γ	<i>Interferon-γ</i>
IL-1 β ; -2; -6	<i>Interleukin-1β; -2; -6</i>
ILAE	<i>International League Against Epilepsy</i>
IP3	<i>Inositol trisphosphate 3</i>
ITGA1	<i>Integrin alpha-1</i>
IVETF	<i>International Veterinary Epilepsy Task Force</i>
JAM3	<i>Junctional adhesion molecule C</i>
JAMs	<i>Junctional associated molecules</i>
KCl	Kaliumchlorid
KCNMA1	<i>Calcium-activated potassium channel subunit alpha-1</i>
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
LC-MS/MS	Liquid-Chromatographie-Tandem-Massenspektrometrie
LEV	Levetiracetam

LMU	Ludwig-Maximilians-Universität München
LTG	Lamotrigin
MAP4K4	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase kinase kinase 4</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinases</i>
MCAM	<i>Cell surface glycoprotein MUC18</i>
MDR1; 2	<i>Multidrug resistance protein 1; 2</i>
MDR1a; 1b	<i>Multidrug resistance protein 1a; 1b</i>
MRP1; 2; 3; 4; 5; 6	<i>Multidrug resistance protein 1; 2; 3; 4; 5; 6</i>
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
MK-571	<i>3-[[3-[2-(7-chloroquinolin-2-yl)vinyl]phenyl]-(2-dimethylcarbamoylethylsulfanyl)methylsulfanyl] propionic acid</i>
MMP-2; -9; -13	<i>Matrix metalloproteinase-2; 9; 13</i>
mRNA	<i>Messenger ribonucleic acid</i>
MRP2	<i>Multidrug resistance-associated protein 2</i>
MYH9	<i>Myosin-9</i>
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NBD	Nukleotidbindungsdomänen
NBD-CSA	<i>[N-^o(4-nitrobenzofurazan-7-yl)-D-Lys^δ]-cyclosporine A</i>
NCL	<i>Nucleolin</i>
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NO	Stickstoffmonoxid
PB	Phenobarbital
PCN	<i>Pregnenolone 16α-carbonitrile</i>
PFA	Paraformaldehyd
Pgp	P-Glykoprotein
PHT	Phenytoin
PI3K	<i>Phosphoinositide 3-kinase</i>
PLC	<i>Phospholipase C</i>
PP2A	Proteinphosphatase 2A
PPAP2B	<i>Lipid phosphate phosphohydrolase 3</i>
PSC-833	Valspodar
PTRF	<i>RNA polymerase I and transkript release factor</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
PXR	<i>Pregnane X receptor</i>
P38-MAP-Kinase	<i>P38 mitogen-activated protein kinase</i>
P42/44-MAP-Kinase	<i>P42/44 mitogen-activated protein kinase</i>

RALA	<i>Ras-related protein Ral-A</i>
RAB5A	<i>Ras-related protein Rab-5A</i>
RASA1	<i>Ras GTPase-activating protein 1</i>
RDX	<i>Radixin</i>
RXR	Retinoid-X-Rezeptor
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
SE	Status epilepticus
SCN2A	<i>Sodium channel protein type 2 subunit alpha</i>
SEM	<i>Standard error of the mean</i> (Standardfehler)
SLC	<i>Solute carrier</i>
Sp-1	<i>Sp1 transcription factor</i>
STAT3	<i>Signal transducer and activator of transcription 3</i>
SRC	<i>Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src</i>
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TBS/T	Tris-gepufferte Kochsalzlösung/ Tween 20
TCPOBOP	<i>1,4-Bis[2-(3,5-dichloropyridyloxy)]benzene</i>
TGB	Tiagabin
TJP1; 2	<i>Tight junction protein ZO-1; -2</i>
TLN	<i>Talin-1</i>
TMD	Transmembrandomäne
TNF α	<i>Tumor necrosis factor alpha</i>
Tie2	Tyrosinrezeptor Tie2
TLE	Temporallappenepilepsie
TPM	Topiramat
UTR	<i>Untranslated region</i>
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
VEGFR-2; -3	<i>Vascular endothelial growth factor receptor 2; -3</i>
VIP	<i>Vasoactive intestinal peptide</i>
VPA	Valproat
ZNS	Zentralnervensystem

I. EINLEITUNG

Epilepsien gehören sowohl in der Tiermedizin als auch in der Humanmedizin zu den häufigsten chronischen Krankheiten. Sie stellen nach Durchblutungsstörungen des Gehirns die häufigste neurologische Erkrankung dar (SCHNEBLE 2003; FISCHER et al. 2013). Mehr als 50 Millionen Menschen weltweit leiden an Epilepsien (SHORVON 1990; BRODIE et al. 1997). Die Mehrheit der an Epilepsien erkrankten Menschen kann mit Antiepileptika (AE) erfolgreich therapiert werden. Trotz der Fortschritte in der Entwicklung neuer AE wird jedoch bei bis zu 30 % der Patienten, was mehr als 20 Millionen Menschen entspricht und zwei Millionen Kinder mit einschließt, durch eine medikamentengestützte Therapie keine adäquate Anfallskontrolle erreicht (KWAN u. BRODIE 2000; LÖSCHER u. POTSCHKA 2005b; GUERRINI 2006). Dieses Phänomen wird als Pharmakoresistenz bezeichnet.

Grundsätzlich ist davon auszugehen, dass die Pharmakoresistenz ein komplexes und multifaktorielles Geschehen darstellt, das noch nicht vollständig verstanden ist. Zur Entstehung einer pharmakoresistenten Epilepsie werden mehrere Hypothesen diskutiert. Neben der *Target*- und der *Intrinsic-severity*-Hypothese wird unter anderem auch eine vermehrte Expression von *Adenosintriphosphat (ATP)-binding cassette (ABC)*-Transportern an der Blut-Hirn-Schranke (BHS) postuliert (Transporter-Hypothese). Eine Überexpression könnte einen Einfluss auf die Wirksamkeit von AE haben (POTSCHKA 2010b). Der exakte Mechanismus einer Überexpression der Transporter ist allerdings noch nicht vollständig geklärt. Es gibt Hinweise auf eine vermehrte Expression einiger ABC-Transporter infolge einer Applikation von AE. Bislang lieferten verschiedene Studien widersprüchliche Daten, die keinen eindeutigen Zusammenhang zwischen der Verabreichung von AE und einer limitierten Gehirngängigkeit der AE erkennen lassen (WEN et al. 2008; WANG et al. 2010; ALMS et al. 2014). In dieser Arbeit soll daher an isolierten Gehirnkapillaren von Schweinen untersucht werden, ob die AE Phenobarbital (PB), Carbamazepin (CBZ) und Topiramat (TPM) in therapeutisch relevanten Konzentrationen im Gehirn Einfluss auf die Expression und auf die Transportaktivität der ABC-Transporter P-Glykoprotein (Pgp), *breast cancer resistance protein* (BCRP) und *multidrug resistance-associated protein 2* (MRP2) haben. Aus klinischer Sicht ist die Klärung der Frage, ob AE durch Induktion von ABC-Transportern ihre eigene Konzentration und damit die Wirksamkeit reduzieren, von besonderem Interesse, da dies die Entstehung einer pharmakoresistenten Epilepsie begünstigen könnte. Somit soll diese Studie eine klinische Relevanz des Einflusses von AE in therapeutisch relevanten Konzentrationen auf Pgp, BCRP und MRP2 überprüfen. Ferner soll sie einen Beitrag zum besseren Verständnis über die Pharmakokinetik von AE sowie anderen ZNS-Therapeutika liefern.

Verglichen mit der pharmakologischen Strategie, Anfälle zu supprimieren, wäre es von größerem klinischen Nutzen, in den Prozess der Epilepsieentstehung (Epileptogenese) präventiv eingreifen zu können. In diesem Zusammenhang ist die Identifikation geeigneter Biomarker zur Vorhersage einer Epilepsieentstehung besonders bedeutsam (ENGEL et al. 2013). Voraussetzung dafür sind umfassende Kenntnisse der pathophysiologischen Mechanismen während der Epileptogenese (HOLTKAMP u. MEIERKORD 2007). Es existieren Hinweise darauf, dass eine geschädigte BHS sowie angiogenetische Prozesse mit der Epileptogenese in Verbindung stehen (SEIFFERT et al. 2004; HELLSTEN et al. 2005; RIGAU et al. 2007; VAN VLIET et al. 2007a). Zudem konnte bisher festgestellt werden, dass eine anhaltende Anfallsaktivität eine vermehrte ABC-Transporter-Expression verursacht und somit zur Entstehung einer pharmakoresistenten Epilepsie beitragen könnte (VAN VLIET et al. 2005; HOFFMANN et al. 2006). Deshalb wurde im Rahmen einer differentiellen Proteomstudie untersucht, welche *pathways* und Proteine der BHS in Zusammenhang mit der Epileptogenese stehen könnten. Grundlage dafür war ein Kooperationsprojekt unserer Arbeitsgruppe mit dem Institut für Tierphysiologie der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München (LMU) und der *Research Unit Protein Science* des Helmholtz-Zentrums München. In diesem Rahmen wurde das Proteom des Hippocampus (HC) und des parahippocampalen Cortex (PHC) analysiert. Im Rahmen meiner Dissertation erfolgten die Identifikation BHS-assoziiierter *pathways* und Proteine während der Epileptogenese und ein sich anschließender immunhistochemischer Expressionsnachweis eines ausgewählten Proteins. Ziel dieser Studie ist es, einen Beitrag zum besseren Verständnis molekularer und zellulärer Veränderungen an der BHS während der Epileptogenese zu leisten. Zudem könnte die vorliegende Studie eine Basis für die Identifikation von Biomarkern oder Zielmolekülen bilden, um die Vorhersage einer Epilepsieentstehung und die Entwicklung antiepileptogener Therapien zu ermöglichen.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Epilepsie

1.1. Definition

Der Vorläuferausdruck „epilepsis“ führt uns in die Antike und geht zurück auf den griechischen Arzt Hippokrates. Das Wort „Epilepsie“ stammt von dem griechischen Wort „epilambanein“, was so viel wie „packen“ oder „jemanden heftig ergreifen“ bedeutet. Der französische Arzt A. Paré soll diesen Begriff zum ersten Mal verwendet haben.

Bereits 1770 versuchte Tissot eine passende Definition für den Krankheitskomplex der Epilepsie zu finden. Er beschrieb die „fallende Sucht“ (Epilepsie) als eine „convulsivische Krankheit, bei deren jedermahligem Auftreten man auf der Stelle die Empfindung und das Bewußtseyn verlieret, und wobei sich zugleich mehr oder weniger gewaltsame zuckende Bewegungen an mehreren oder wenigern Theilen des Körpers eintreten“ (KRÄMER 2012).

Die *International League Against Epilepsy* (ILAE) und das *International Bureau for Epilepsy* (IBE) einigten sich 2005 auf eine einheitliche Definition für die Begriffe „Epileptischer Anfall“ und „Epilepsie“. Demnach ist ein epileptischer Anfall definiert als ein vorübergehendes Auftreten von krankhaften Befunden und/oder Symptomen aufgrund einer pathologisch exzessiven oder synchronen neuronalen Aktivität im Gehirn. Die Epilepsie wurde 2005 definiert als eine Störung des Gehirns, die durch eine dauerhafte Neigung zur Entwicklung epileptischer Anfälle sowie durch die neurobiologischen, kognitiven, psychologischen und sozialen Konsequenzen dieses Zustands gekennzeichnet ist. Diese Definition setzt dauerhafte Veränderungen im Gehirn voraus, die die Wahrscheinlichkeit weiterer Anfälle erhöht. Daher erfolgt die Diagnose Epilepsie infolge eines epileptischen Anfalls, in deren Konsequenz es in Verbindung mit einer dauerhaften Störung des Gehirns zu weiteren Anfällen kommen kann (FISHER et al. 2005). Diese Definition von 2005 für den Begriff der Epilepsie erschien allerdings zu begrifflich und theoretisch und lieferte für den konkreten Einzelfall keine hinreichenden Kriterien zur Diagnose einer Epilepsieerkrankung. Daher entschied sich die ILAE, eine für die Praxis besser anwendbare Definition der Epilepsie zu erarbeiten.

Demnach wird eine Epilepsieerkrankung in Betracht gezogen, wenn einer der folgenden Punkte zutrifft:

- Das Auftreten von mindestens zwei nicht provozierten Anfällen im Abstand von mehr als 24 Stunden,
- ein nicht provozierter Anfall mit einer Wahrscheinlichkeit von mehr als 60 %, weitere

- Anfälle innerhalb der nächsten zehn Jahre zu entwickeln (entsprechend dem Risiko nach zwei nicht provozierten Anfällen),
- die Diagnose eines Epilepsiesyndroms (FISHER et al. 2014).

1.2. Klassifizierung

Die alte Klassifikation für epileptische Anfälle (1981) und Epilepsie bzw. Epilepsiesyndrome (1989) beruhte auf Konzepten, die vor allem aus der Zeit vor Einführung moderner Bildgebungsverfahren, Gentechnologie und molekularbiologischer Ansätze stammen. Sie basierte überwiegend auf klinischen Beobachtungen und Expertenmeinungen. Aus diesem Grund überarbeitete die ILAE die Einteilung von Epilepsien und definierte die alte Klassifikation und deren Konzepte neu (BERG et al. 2010).

Die frühere Einteilung von epileptischen Anfällen in „generalisiert“ und „fokal“ wurde von der ILAE überarbeitet. Demnach wird unterschieden in Anfälle, die „in einem bilateral verteilten Netzwerk auftreten und sich dort rasch ausbreiten (generalisiert) oder aber in einem auf eine Großhemisphäre beschränkten Netzwerk auftreten und dabei eng umschrieben oder weiter ausgebreitet sein können (fokal)“ (BERG et al. 2010).

Auch die ätiologische Einteilung von Epilepsie in „idiopathisch“, „symptomatisch“ und „kryptogen“ wurde modifiziert und unterscheidet jetzt zwischen „genetisch“, „strukturell-metabolisch“ und „unbekannt“.

Die Epilepsieformen werden eingeteilt in elektroklinische Syndrome, nicht-syndromatische Epilepsien mit strukturell-metabolischen Ursachen und Epilepsien unbekannter Ursache. Innerhalb dieser Gruppen kann wiederum eine flexible, weitere Unterteilung erfolgen (BERG u. SCHEFFER 2011).

Abbildung 1 zeigt die aktuelle Einteilung epileptischer Anfälle.

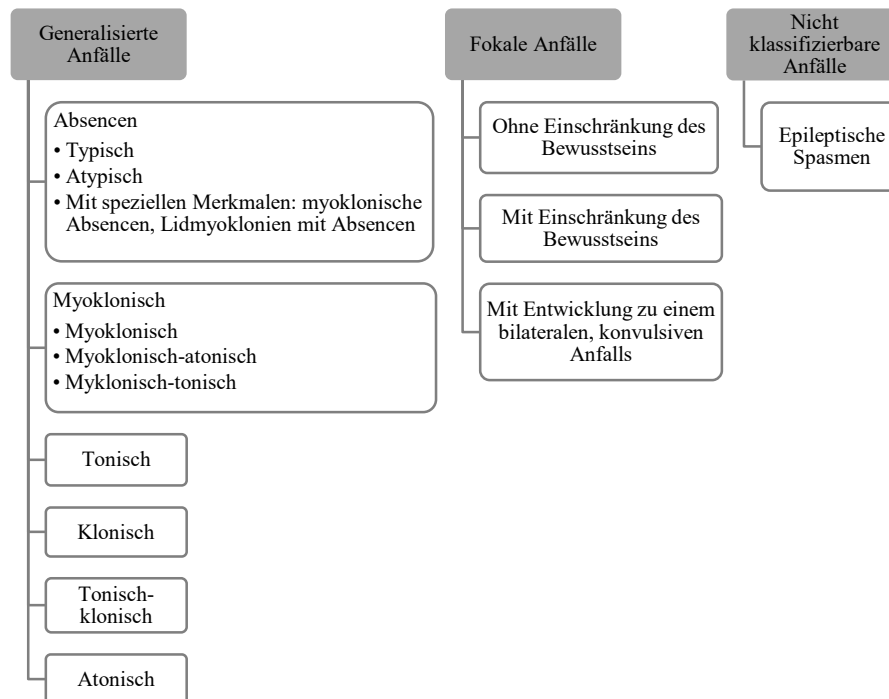


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Klassifikation der Epilepsie. Modifiziert nach Berg et al. (BERG et al. 2010). Abbildung mit freundlicher Genehmigung von John Wiley and Sons.

1.3. Epileptogenese

Der Begriff der Epileptogenese wird definiert als Prozess der Epilepsieentstehung. Ein initialer Insult kann beispielsweise verursacht werden durch ein Schädel-Hirn-Trauma, einen Schlaganfall, eine Infektion oder länger anhaltende epileptische Anfälle (PITKANEN u. LUKASIUK 2009). Dies löst eine Kaskade molekularer und zellulärer Veränderungen sowie Modifizierungen des neuronalen Netzes aus, die schließlich zur Entstehung spontaner Anfälle führen können. Der Begriff der Epileptogenese verweist auf den Zeitraum zwischen gehirnschädigendem Insult und dem Auftreten erster spontaner Anfälle (PITKANEN u. LUKASIUK 2009; RAKHADE u. JENSEN 2009). Allerdings gibt es Hinweise darauf, dass die molekularen und zellulären epileptogenen Veränderungen nach dem Auftreten des ersten spontanen Anfalls noch fortschreiten. Somit wäre der Prozess der Epileptogenese mit dem Auftreten des ersten Anfalls noch nicht abgeschlossen (PITKANEN u. SUTULA 2002; PITKANEN u. LUKASIUK 2009; PITKANEN 2010).

Entsprechend der stattfindenden Veränderung im Gehirn lässt sich die Epileptogenese in unterschiedliche Phasen unterteilen. In der frühen Post-Insult-Phase, die wenige Minuten bis Tage nach dem initialen Insult eintritt, finden durch Depolarisation der Membran, durch posttranslationale Modifikationen sowie durch Aktivierung sog. *immediate early genes* Verände-

rungen in der Kinetik der Membrankanäle statt (MCNAMARA et al. 2006; CORNEJO et al. 2007; JENSEN 2009). Nach Stunden bis Tagen schließt sich an die Post-Insult-Phase die Latenzphase an, in der es unter anderem zum neuronalen Zelltod, zu einem inflammatorischen Geschehen und zur veränderten transkriptionalen Regulationen von Genen (z. B. Wachstumsfaktoren codierende Gene) kommt (VEZZANI u. GRANATA 2005; SCHARFMAN 2007). Chronische Veränderungen sind charakterisiert durch Modifikationen morphologischer Art wie die Gliose, die Neurogenese oder das sog. *mossy fiber sprouting* (DUDEK u. SUTULA 2007; RAKHADE u. JENSEN 2009).

Der aktuelle Wissensstand über den Prozess der Epileptogenese profitierte maßgeblich von der Durchführung tierexperimenteller Studien. Chronische Tiermodelle, in denen beispielsweise ein elektrischer initialer Insult gesetzt wird [Status epilepticus (SE)-basolaterale Amygdala (BLA)-Modell] und es nach einer Latenzphase zum Auftreten spontaner Anfälle kommt, spielen dabei eine wesentliche Rolle. Diese Tiermodelle induzieren typische molekulare und zelluläre Veränderungen im Gehirn des Tieres, die denen ähneln, die im Gehirngewebe von Patienten mit einer Temporallappenepilepsie (TLE) vorkommen (PITKANEN u. LUKASIUK 2009).

2. Blut-Hirn-Schranke

Alle Organismen mit einem voll entwickelten Zentralnervensystem (ZNS) besitzen eine BHS. Sie stellt eine physiologische Barriere zwischen Blutkreislauf und ZNS dar. Zum einen schützt sie das Gehirn vor schädlichen endogenen und exogenen Substanzen, zum anderen ist sie auch eine Barriere für Medikamente, die zu therapeutischen Zwecken ins Gehirn gelangen sollen.

Die BHS wird von kapillären Endothelzellen gebildet, die durch sog. Tight Junctions verbunden sind. Diese Tight Junctions tragen in relevanter Weise zur Schutzfunktion bei. Sie verringern das Übertreten von polaren Substanzen vom Blutplasma in die extrazelluläre Flüssigkeit des Gehirns durch parazelluläre Diffusion (WOLBURG et al. 2009). Tight-Junction-Proteine werden unter anderen aus den zytoplasmatischen Proteinen *tight junction protein ZO-1,-2* und *-3* (TJP1, 2 und 3 auch ZO1, ZO2 und ZO3 genannt) gebildet, die mit Transmembranproteinen wie Occludin, den Claudinen, den *junctional associated molecules* (JAMs) und dem *endothelial cell adhesion molecule* (ESAM) verbunden sind und so eine transmembrane Barriere ausbilden (STEVENSON et al. 1986; GUMBINER et al. 1991; BALDA et al. 1993). Die kapillären Endothelzellen sind von einer Basallamina umgeben, über die sie mit den Perizyten, Astrozyten und Neuronen in Kontakt stehen (PARDRIDGE 2005). Astrozyten sind Gliazellen des ZNS mit wichtigen strukturellen und funktionellen Aufgaben (HASELOFF et al. 2005). Sie verbessern beispielsweise die Expression von Glukose-Transportern, steigern den transendothelialen Widerstand, erhöhen die Anzahl, die Länge und die Komplexität der Tight Junctions und erhöhen die Barriere-assoziierten Marker-Enzym-Aktivitäten wie die der γ -Glutamyl Transpeptidase und der alkalischen Phosphatase (JANZER u. RAFF 1987; HASELOFF et al. 2005). Perizyten gehören zu den Bindegewebszellen und liegen der Außenwand von Kapillaren an. Sie spielen eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung der BHS. Zu den Funktionen der Perizyten gehören beispielsweise die Formation und Aufrechterhaltung der Tight Junctions, die Differenzierung der BHS, die Produktion von immunregulatorischen Zytokinen wie *Interleukin-1 β* (IL-1 β), *Interleukin-6* (IL-6) und *granulocyte macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF), die Regulation der Leukozyten-Transmigration, die Antigenpräsentation und die T-Zell-Aktivierung. Außerdem sind sie an angiogenetischen Prozessen im Gehirn durch Sekretion von Angiopoietin-1 beteiligt. Sie kontrollieren zudem die zerebrovaskuläre Autoregulation und die Verteilung des Blutflusses (LAI u. KUO 2005).

Der strukturelle Aufbau der BHS ist in Abbildung 2 dargestellt.

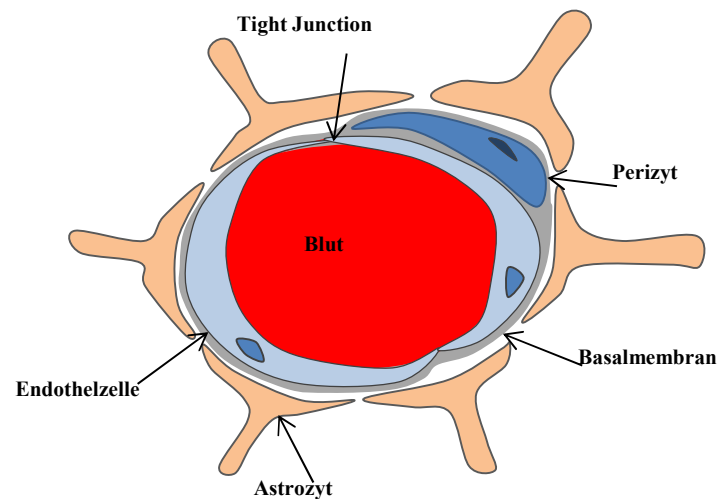


Abbildung 2: Struktureller Aufbau der BHS. Modifiziert nach Löscher und Potschka (LÖSCHER u. POTSCHKA 2005c). Abbildung mit freundlicher Genehmigung von Elsevier.

Die BHS kann auf verschiedenen Wegen überwunden werden, bei denen verschiedene Stoffe vom Blut in das Gehirn übertreten können. Eine Vielzahl lipidlöslicher Moleküle kann passiv durch die BHS diffundieren (LIU et al. 2004b). Polare, für die Versorgung des Gehirnparenchyms notwendige Nährstoffe wie Glukose und Aminosäuren können diese Barriere durch spezifische *solute carrier* (SLC)-Transportsysteme überwinden. Einige Proteine, wie Insulin und Transferrin, gelangen durch spezifische rezeptorvermittelte Endozytose und Transzytose ins Gehirn. Albumin und andere native Plasmaproteine können nur schlecht transportiert werden, weshalb sie unter physiologischen Bedingungen nicht im Gehirn zu finden sind. Eine Kationisierung dieser Proteine kann allerdings die Aufnahme durch absorptiv-vermittelte Endozytose und Transzytose erhöhen (ABBOTT et al. 2006).

Demgegenüber können Transportsysteme wie die sog. ABC-Transporter gelöste endogene Substanzen sowie Wirkstoffe in die entgegengesetzte Richtung, also vom Gehirnparenchym oder dem Kapillarendothel ins Blut transportieren (BEGLEY 2004). Die wichtigsten ABC-Transporter sind Pgp, die Transporter der MRP-Familie und BCRP (ABBOTT et al. 2010).

Die Funktion der BHS ergibt sich aus dem Zusammenspiel einer physikalischen Barriere (Tight Junctions), einer Transportbarriere (spezifische Transportmechanismen) und einer metabolischen Barriere (metabolische Enzymmoleküle), die im Hinblick auf die Physiologie und Pathologie moduliert und reguliert werden kann. Eine Aufgabe der BHS besteht in der Regulierung der Ionenkonzentration von K^+ , Ca^{++} , Mg^{++} , dem pH und der Neurotransmitterkonzentration. Außerdem stellen spezifische Transportsysteme an der BHS durch den Transport notwendiger löslicher Nährstoffe und Metaboliten die Versorgung des Gehirnparenchyms sicher (ABBOTT 2005). Darüber hinaus schützt sie das Gehirn auch vor Makromolekülen,

wie z. B. Albumin, Pro-Thrombin und Plasminogen, dessen Übertritt ins Gehirngewebe Anfälle, Gliaaktivierung, Gliazellteilung, Zelltod und Narbenbildung zur Folge haben könnte (GINGRICH u. TRAYNELIS 2000). Zudem schirmt die BHS mithilfe von ABC-Transportern das Gehirn von im Blut zirkulierenden „Nervengiften“ ab, die sowohl endogene Metaboliten, Proteine oder Xenobiotika als auch exogene Schadstoffe aus der Umwelt sein können. Viele dieser Schadstoffe werden mithilfe von ABC-Transportern aktiv aus dem Gehirn zurück ins Blut befördert, sodass keine schädlichen Konzentrationen im Gehirn erreicht werden können. (ABBOTT 2005).

3. ABC-Transporter

Die Pharmakotherapie von ZNS-Erkrankungen wird in großem Maße von der BHS beeinflusst. Dort spielen vor allem ATP-getriebene Efflux-Transporter eine große Rolle, die die Gehirngängigkeit vieler Medikamente limitieren (OTT et al. 2009). Die meisten dieser Transporter gehören zu der Superfamilie der ABC-Transporter (LÖSCHER u. POTSCHKA 2005b). Sie umfassen eine Anzahl von 48 Vertretern, die basierend auf ihren strukturellen Eigenschaften in sieben Sub-Familien eingeteilt werden (DEAN et al. 2001b).

Die ABC-Transporter unterscheiden sich in ihrer modularen Architektur. Sie bestehen aus mindestens einer sich im Zytoplasma lokalisierten hydrophilen Nukleotidbindungsdomäne (NBD) und einer hydrophoben Transmembrandomäne (TMD). Abhängig von ihrer Struktur und ihrer Anordnung der Nukleotidbindungsdomänen und der Transmembrandomäne lassen sich die ABC-Transporter in Voll-Transporter, Halb-Transporter und Nicht-Transporter einteilen (MO et al. 2012).

Unter physiologischen Bedingungen sind ABC-Transporter der BHS zur Gehirnparenchym gerichteten (abluminalen) und zum Blut gerichteten (luminalen) Seite von Endothelzellen der Gehirnkapillaren sowie in geringem Maß an den parenchymalen und perivaskulären Astrozyten lokalisiert (LÖSCHER u. POTSCHKA 2005a).

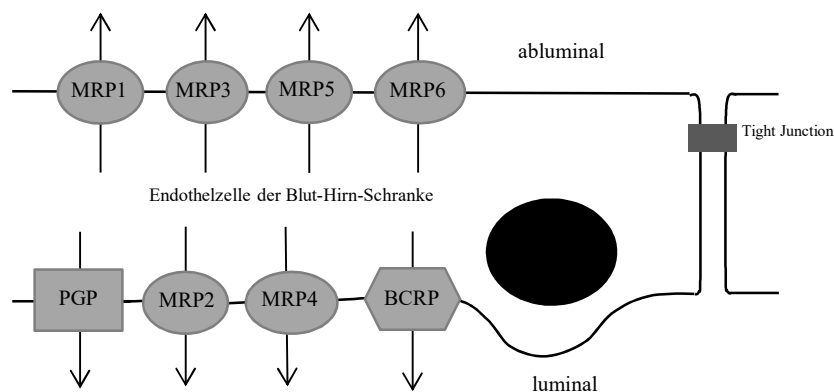


Abbildung 3: Lokalisation ausgewählter ABC-Transporter an kapillären Gehirndothelzellen. *Multidrug resistance-associated protein 1* (MRP1), *multidrug resistance-associated protein 3* (MRP3), *multidrug resistance-associated protein 5* (MRP5) und *multidrug resistance-associated protein 6* (MRP6) sind an der abluminalen Seite des kapillären Gehirndothels exprimiert. Nur die sich an der luminalen Seite befindlichen Transporter P-Glykoprotein (PGP), *multidrug resistance-associated protein 2* (MRP2), *multidrug resistance-associated protein 4* (MRP4) und *breast cancer resistance protein* (BCRP) haben eine relevante Schutzfunktion gegenüber Xenobiotika. Modifiziert nach Löscher und Potschka (LÖSCHER u. POTSCHKA 2005a). Abbildung mit freundlicher Genehmigung von Springer.

ABC-Transporter werden des Weiteren im Darm, der Leber und der Niere exprimiert, wo sie eine wichtige Aufgabe im Medikamentenmetabolismus, insbesondere in der Medikamentenaufnahme, -verteilung und -ausscheidung, erfüllen (SCHINKEL u. JONKER 2003).

Früher wurde die Meinung vertreten, dass Membrantransporter an der BHS lediglich für den Transport endogener Substanzen ins Gehirn bzw. aus dem Gehirn heraus zuständig seien und der Transport durch die BHS von den physiochemischen Charakteristika, wie Lipophilie, Molekulargewicht und Ionenladung abhängig sei. Heute weiß man aber, dass diese Transportsysteme auch die Aufnahme einer Vielzahl therapeutischer Stoffe, wie Zytostatika, AE und HIV (Humane Immundefizienz-Virus)-Proteaseinhibitoren, in das Gehirn limitieren (GOLDEN u. POLLACK 2003; LÖSCHER u. POTSCHKA 2005a). Dabei spielen vor allem Pgp, MRP 2 und BCRP eine wichtige Rolle in Bezug auf die selektive Durchlässigkeit der BHS (SUN et al. 2003).

3.1. P-Glykoprotein

Der ABC-Transporter Pgp wurde vor 30 Jahren in humanen, multiresistenten Tumorzellen entdeckt (JULIANO u. LING 1976). Es existieren zwei Typen von humanem Pgp (Typ 1 und Typ 2), die jeweils von zwei verschiedenen Genen codiert werden [*multidrug resistance protein 1* (MDR1), *multidrug resistance protein 2* (MDR2)]. Bei der Maus hingegen gibt es lediglich einen, von zwei Genen codierten Typ [*multidrug resistance protein 1 a* (MDR1A), *multidrug resistance protein 1 b* (MDR1B)] (DEMEULE et al. 2002). Die Molekularmasse von Pgp liegt bei 170 kDa (SUN et al. 2003). Der strukturelle Aufbau von Pgp besteht aus zwei TMD mit jeweils sechs transmembranen Segmenten und zwei NBD.

Ein strukturelles und topologisches Modell von Pgp ist in Abbildung 4 dargestellt.

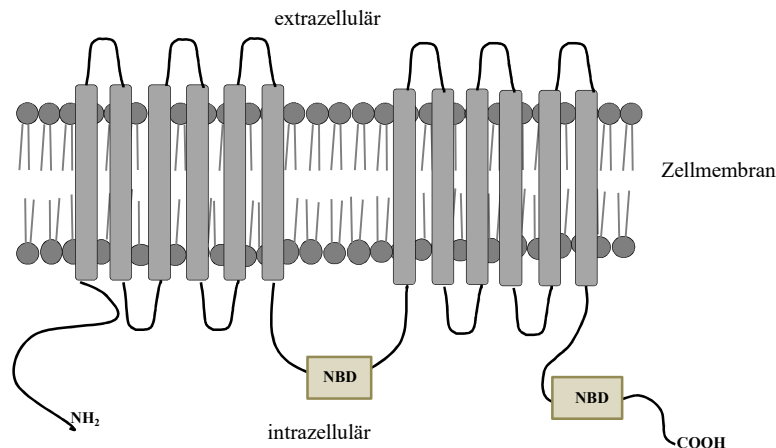


Abbildung 4: Strukturelles und topographisches Modell des ABC-Transporters P-Glykoprotein (Pgp). Pgp besteht aus zwei Nukleotidbindungsdomänen (NBD) und zwei Transmembrandomänen (TMD) mit jeweils sechs transmembranen Segmenten. Modifiziert nach Dalvi et al. (DALVI et al. 2014). Abbildung mit freundlicher Genehmigung von InTech.

Als erster ABC-Transporter wurde Pgp 1989 in humanen Endothelzellen der BHS nachgewiesen (CORDON-CARDO et al. 1989). Dort erfolgt die Expression von Pgp sowohl an der luminalen Seite der kapillären Endothelzellen (SCHINKEL 1999) als auch an den Endfüßchen der perivaskulären Astrozyten (DEMEULE et al. 2002; LÖSCHER u. POTSCHKA 2005c). Neben der Lokalisation in Endothelzellen der BHS wird Pgp zudem in der Leber, der Niere, der Nebenniere, der Plazenta, dem Dün- und Dickdarm, sowie in kapillären Endothelzellen des Hodens exprimiert (FOJO et al. 1987; THIEBAUT et al. 1987; SUGAWARA et al. 1988). Pgp besitzt ein sehr breites Substratspektrum (z. B. Zytostatika, Kortikoide, AE, Antibiotika, Anthelminthika, Antidepressiva, Histamine) und stellt das größte Hindernis für die Gehirngängigkeit dieser therapeutischen Medikamente dar. Deshalb wird Pgp als molekulare Basis für das vorklinische und klinische Versagen einiger Medikamente angesehen (LÖSCHER u. POTSCHKA 2005b; MILLER et al. 2008). In einer tierexperimentellen Studie an Mäusen konnte gezeigt werden, dass die Gehirngängigkeit vieler Medikamente bei Pgp-*knock-out*-Mäusen, verglichen mit Kontrollen von Wildtyp-Mäusen, um ein zehn- bis 100-faches erhöht ist (SCHINKEL et al. 1994).

Die besondere Bedeutung von Pgp in Bezug auf die Schutzfunktion und die Gehirngängigkeit einiger Medikamente wird bei einigen Hunderassen, wie z. B. dem Australien Shepard, deutlich. Infolge eines MDR1-Gendefektes kann es bei diesen Hunderassen zu einer mangelnden Expression des Pgp-Transporters kommen. Dies kann bei Einnahme von gewissen Medikamenten (z. B. Ivermectin) zu einer Neurotoxizität führen (MEALEY et al. 2001; NELSON et al. 2003).

3.2. *Breast cancer resistance protein*

BCRP wurde 1998 das erste Mal in chemotherapieresistenten Brusttumorzellen nachgewiesen (DOYLE et al. 1998). Es gibt allerdings keinen Hinweis darauf, dass das Auftreten von BCRP spezifisch für Brusttumorzellen ist oder dass BCRP eine besonders wichtige Rolle in chemotherapieresistenten Brusttumorzellen spielt. BCRP wird zur C-Subfamilie der ABC-Transporter gezählt. Mindestens fünf Vertreter der *ATP-binding cassette sub-family G* (ABCG)-Familie (ABCG1, ABCG2, ABCG4, ABCG5 und ABCG8) konnten bislang beim Menschen nachgewiesen werden. Allerdings hat nur ABCG2 einen Einfluss auf den Transport von Substanzen zwischen Blut und Gehirn an der BHS (NICOLAZZO u. KATNENI 2009). BCRP wird von dem ABCG2-Gen codiert, setzt sich aus 665 Aminosäuren zusammen und weist eine molekulare Masse von 72 kDa auf (DOYLE et al. 1998; KAGE et al. 2002; LITMAN et al. 2002).

BCRP unterscheidet sich in seiner Struktur von anderen ABC-Transportern. Es besteht lediglich aus einer NBD und einer TMD (siehe Abbildung 5). BCRP zählt daher zu den Halbtransportern (DEAN et al. 2001b). Halbtransporter müssen im Gegensatz zu Volltransportern (z. B. Pgp und MRPs) Homodimere oder Heterodimere bilden, um ihre Funktion als Transporter erfüllen zu können (BHATIA et al. 2005; MCDEVITT et al. 2006).

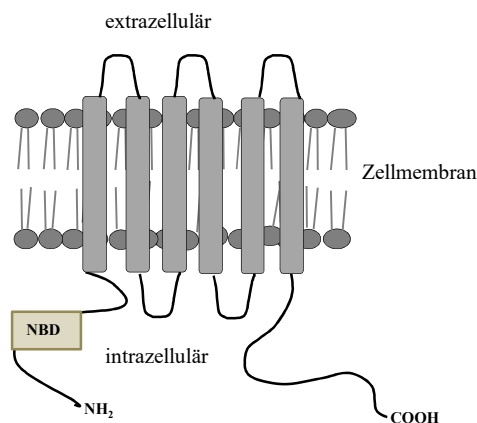


Abbildung 5: Strukturelles und topographisches Modell des ABC-Transporters *breast cancer resistance protein* (BCRP). BCRP besteht aus einer Nukleotidbindungsdomäne (NBD) und einer Transmembranbindungsdomäne (TMD), die sechs transmembrane Segmente aufweist. Modifiziert nach Dalvi et al. (DALVI et al. 2014). Abbildung mit freundlicher Genehmigung von InTech.

BCRP befindet sich bei Mäusen, Schweinen und beim Menschen hauptsächlich an der luminalen Seite von Kapillarendothelzellen (COORAY et al. 2002; EISENBLATTER et al. 2003; CISTERNINO et al. 2004). Es wird annähernd in den gleichen Organen exprimiert wie Pgp. Basierend auf *Messenger-ribonucleic-acid*-(mRNA)-Analysen konnte allerdings nachgewie-

sen werden, dass BCRP an der BHS stärker exprimiert ist als *multidrug resistance-associated protein 1* (MRP1) oder Pgp (EISENBLATTER et al. 2003). Dies weist darauf hin, dass auch BCRP Gewebe vor potentiell schädlichen Xenobiotika schützt (SCHINKEL u. JONKER 2003). Zudem konnte eine kompensatorische Expression des BCRP bei MDR1A-*knock-out*-Mäusen festgestellt werden. Sie zeigten bei Fehlen von Pgp eine im Vergleich zu Wildtypen dreifach vermehrte BCRP-Expression (CISTERNINO et al. 2004).

BCRP weist eine ähnliche Substratspezifität wie andere ABC-Transporter auf (z. B. Zytostatika, HIV-Proteaseinhibitoren), ist aber in der Lage, hydrophile konjugierte organische Anionen, besonders sulfatierte Konjugate mit hoher Affinität, zu transportieren (KODAIRA et al. 2010).

3.3. *Multidrug resistance-associated protein 2*

Die MRP-Familie [*ATP-binding cassette sub-family C*, (ABCC)] umfasst eine Gruppe von 12 Transportern, von denen 1992 der Vertreter MRP1 erstmals in Tumorzellen entdeckt wurde. Eine Funktion als ABC-Transporter in der Absorption, Verteilung und Eliminierung von Metaboliten und verschiedener Wirkstoffen wird lediglich neun der 12 MRPs zugesprochen (DALVI et al. 2014). MRP2 wird von dem ABCC2-Gen codiert. Es besteht aus 1545 Aminosäuren und weist ein Molekulargewicht von 190 kDa auf. Die Aminosäuresequenzen zwischen den verschiedenen Mitgliedern der MRP-Familie unterscheiden sich teilweise erheblich. Vergleicht man die homologen Aminosäuresequenzen der unterschiedlichen MRP-Mitglieder mit MRP1, so ergibt sich eine Übereinstimmung, die im Bereich von 33 % für *multidrug resistance-associated protein 8* (MRP8) bis 58 % für *multidrug resistance-associated protein 3* (MRP3) liegt (KEPPLER 2011).

Auch im strukturellen Aufbau unterscheiden sich MRPs voneinander. Sie können grundsätzlich in zwei verschiedene Struktur-Modelle eingeteilt werden. MRP1, MRP2 und MRP3 bestehen aus drei TMD, von denen jeweils zwei aus sechs transmembranen Segmenten und eine aus fünf transmembranen Segmenten aufgebaut sind (Abbildung 6). *Multidrug resistance-associated protein 4* (MRP4) und *multidrug resistance-associated protein 5* (MRP5) bestehen hingegen nur aus zwei TMD mit jeweils sechs transmembranen Segmenten. Gleich sind den beiden unterschiedlichen Strukturen zwei NBD (LÖSCHER u. POTSCHKA 2005c).

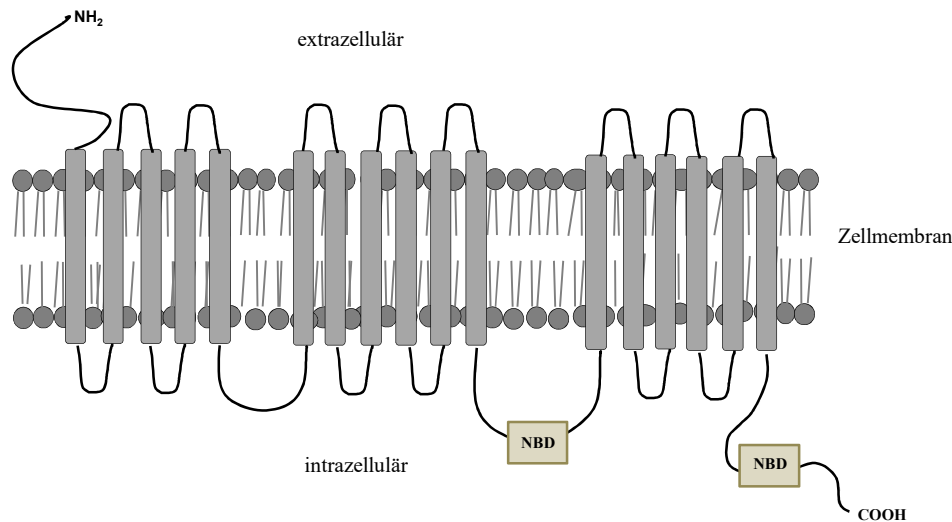


Abbildung 6: Strukturelles und topographisches Modell der ABC-Transporter *multidrug resistance-associated protein 1* (MRP1), *multidrug resistance-associated protein 2* (MRP2) und *multidrug resistance-associated protein 3* (MRP3). MRP1, MRP2 und MRP3 bestehen aus zwei Nukleotidbindungsdomänen (NBD) und drei Transmembrandomänen (TMD), von denen zwei aus sechs transmembranen Segmenten und eine aus fünf transmembranen Segmenten aufgebaut sind. Modifiziert nach Dalvi et al. (DALVI et al. 2014). Abbildung mit freundlicher Genehmigung von InTech.

Vertreter der MRP-Familie fungieren als organische Anionen-Transporter. Sie sind aber auch in der Lage, neutrale organische Medikamente zu transportieren (BORST et al. 2000). Die meisten MRP-Transporter sind an der basolateralen Seite der Kapillargefäße der BHS lokalisiert. Nur einige wenige MRP-Transporter, wie MRP2 und MRP4, befinden sich luminal und sind daher in der Beschränkung der Gehirngängigkeit von MRP-Substraten (z. B. AE, Zytostatika, HIV-Proteaseinhibitoren) involviert (LÖSCHER u. POTSCHKA 2005a; LÖSCHER u. POTSCHKA 2005b).

4. Pharmakoresistente Epilepsie

Epilepsien zählen bei Hunden und Katzen zu den häufigsten chronischen neurologischen Erkrankungen (CHANDLER 2006; SMITH BAILEY u. DEWEY 2009). 20-40 % der Tiere können mit AE nicht zufriedenstellend therapiert werden (LOSCHER 2003). Viele der veterinärmedizinischen Patienten, die an einer pharmakoresistenten Epilepsie leiden, werden euthanasiert (LOSCHER 2003; POTSCHKA et al. 2015). Auch in der Humanmedizin stellt die Epilepsie eine ernst zu nehmende neurologische Erkrankung dar, bei der 30 % der 50 Millionen an Epilepsie erkrankten Menschen pharmakoresistent sind (KWAN u. BRODIE 2000). Die TLE mit komplex fokalen Anfällen stellt mit 70-80 %, den größten Anteil pharmakoresistenter Epilepsien dar (LEPPIK 1992). Plötzliche und frühzeitige Todesfälle, Verletzungen, psychosoziale Störungen sowie eine verminderte Lebensqualität sind nur einige der daraus resultierenden Konsequenzen für diese Patienten (LAWN et al. 2004; MOHANRAJ et al. 2006; MCCAGH et al. 2009).

Unter den Begriff der Pharmakoresistenz versteht man das Versagen von zwei, mit angemessen ausgewählten AE in Mono- oder Kombinationstherapie durchgeführten Behandlungsversuchen, um eine anhaltende Anfallsfreiheit zu erzielen (KWAN et al. 2010). Die *International Veterinary Epilepsy Task Force* (IVETF) schlägt vor, diese für die Humanmedizin empfohlene Definition der Pharmakoresistenz auch in der Veterinärmedizin anzuwenden. Dabei ist zu berücksichtigen, dass selbst eine Verbesserung einer therapeutischen Behandlung von veterinärmedizinischen Patienten mit pharmakoresistenter Epilepsie einen Therapieerfolg darstellt, der einen Einfluss auf die Entscheidung für oder gegen eine Euthanasie haben könnte (POTSCHKA et al. 2015).

Eine erfolgreiche medikamentöse Therapie ist von mehreren Faktoren, wie dem Typ, der Ätiologie und der Dauer der Epilepsie, der Anzahl an zuvor erfolglosen Behandlungsversuchen, dem Grad der mentalen Entwicklungsstörung sowie vielen anderen Einflussfaktoren, abhängig (REGESTA u. TANGANELLI 1999; KWAN u. BRODIE 2002; SCHMIDT u. LOSCHER 2005). Ein Hinweis auf eine schwer therapierbare Epilepsie ist die initiale Anfallsfrequenz (SCHMIDT u. LOSCHER 2005). Das erfolglose Ansprechen einer initialen medikamentösen Behandlung mit AE scheint allerdings der stärkste prognostische Indikator einer pharmakoresistenten Epilepsie zu sein (KWAN u. BRODIE 2000). Eine pharmakoresistente Epilepsie ist bei vielen betroffenen Patienten schon vor Beginn der ersten medikamentösen Behandlung vorhanden. Allerdings kann sich auch bei zunächst gut therapierbaren Epilepsiepatienten eine Pharmakoresistenz erst während der Behandlung mit AE manifestieren

(SCHMIDT u. LOSCHER 2005). Eine chirurgische Entfernung des epileptischen Gewebes in Kombination mit einer lebenslangen Pharmakotherapie ist bei Patienten mit pharmakoresistenter Epilepsie oft die letzte Möglichkeit, eine anhaltende Anfallsfreiheit zu erreichen (LÖSCHER u. SCHMIDT 2002). Voraussetzung ist dabei eine umfassende prächirurgische Evaluierung mit exakter Identifizierung und Lokalisation des epileptischen Fokus (FOLDVARY et al. 2001). Weitere alternative humanmedizinische Behandlungsmöglichkeiten bei pharmakoresistenten Epilepsien stellen die Vagusnerv-Stimulation (LÖSCHER u. SCHMIDT 2002), die Tiefenhirnstimulation thalamischer Kerngebiete (AKAMATSU u. TSUJI 2011), die transcranielle Magnetstimulation (KWAN u. BRODIE 2006) und die ketogene Diät dar (ITO u. OGUNI 2011).

Die Schwierigkeit der Überwindung einer Pharmakoresistenz resultiert aus der Tatsache, dass den Mechanismen der Pharmakoresistenz ein variables und multifaktorielles Geschehen zugrunde liegt. Dabei sind sowohl genetische, krankheitsbedingte als auch pharmakotherapiebedingte Faktoren beteiligt (REGESTA u. TANGANELLI 1999; KWAN u. BRODIE 2002; LÖSCHER u. POTSCHKA 2002).

Es werden vorwiegend drei verschiedene zelluläre Mechanismen diskutiert, die zu einer Pharmakoresistenz führen können: Die *Target*-Hypothese, die Transporter-Hypothese und die *Intrinsic-severity*-Hypothese.

4.1. *Target*-Hypothese

AE vermitteln ihre Wirkung über Zielstrukturen im Gehirn wie spannungsabhängige Ionenkanäle, Transporter und metabolische Enzyme der Neurotransmitter. Die *Target*-Hypothese behauptet als Grund für ein reduziertes therapeutisches Ansprechen von Antiepileptika eine Veränderung dieser zellulären Zielstrukturen (ROGAWSKI u. LÖSCHER 2004; REMY u. BECK 2006). Die *Target*-Hypothese wird überwiegend auf Versuche mit CBZ und dessen Wirkung auf spannungsgesteuerte Natriumkanäle an hippocampalen Neuronen gestützt (VREUGDENHIL et al. 1998; REMY et al. 2003). 1998 wurde erstmals eine verringerte modulatorische Wirkung spannungsgesteuerter Natriumkanäle durch CBZ bei Patienten mit therapieresistenter Epilepsie nachgewiesen (VREUGDENHIL et al. 1998). In weiteren Studien konnte unter anderem gezeigt werden, dass die Natriumkanäle in Zellen des Gyrus dentatus im resezierten HC von Patienten mit CBZ-resistenter TLE nicht mehr durch CBZ blockiert werden konnten (REMY et al. 2003). Für Lamotrigin (LTG), das ein vergleichbares pharmakologisches Wirkspektrum wie CBZ aufweist, konnte dies allerdings nicht bestätigt werden (REMY et al. 2003). Zudem konnte festgestellt werden, dass Polymorphismen des *Sodium*

channel type 2 subunit alpha (SCN2A)-Gens, das die α_2 -Untereinheit neuronaler Natriumkanäle codiert, mit einer Resistenz gegenüber AE in Verbindung stehen (KWAN et al. 2008). Neben den Beobachtungen zu möglichen Veränderungen spannungsgesteuerter Natriumkanäle wurde darüber hinaus bei Patienten mit pharmakoresistenter TLE eine veränderte Expression der Subtypen des γ -Aminobuttersäurerezeptors des Typs A (GABA_A-Rezeptor) beobachtet (LOUP et al. 2009).

Diese Hypothese wird allerdings kontrovers diskutiert, da viele Epilepsiepatienten eine Pharmakoresistenz gegenüber mehreren AE mit unterschiedlichen Wirkmechanismen aufweisen, von denen außerdem manche noch immer nicht vollständig geklärt sind (KWAN et al. 2011).

4.2. Transporter-Hypothese

ABC-Transporter haben einen großen Einfluss auf die Pharmakokinetik von Wirkstoffen. Dabei werden insbesondere die Wirkstoffaufnahme, -verteilung und -ausscheidung beeinflusst. Aus diesem Grund spielen sie für die Wirksamkeit vieler klinisch verwendeter Wirkstoffe eine entscheidende Rolle (SCHINKEL u. JONKER 2003). Einige Transportsysteme können in ihrer Funktion zu einer Resistenz einer Vielzahl von Wirkstoffen beitragen (sog. *Multidrug*-Resistenz), wodurch sie zu einem therapeutischen Versagen bei Tumoren, Infektionskrankheiten und Gehirnkrankheiten wie z. B. der Epilepsie führen (LÖSCHER 2005).

Die Transporter-Hypothese geht davon aus, dass eine vermehrte Expression der Transportsysteme zu einem Ausschleusen der AE vom intrazellulären Raum zurück ins kapilläre Lumen führt. Ein therapeutischer Erfolg bleibt infolge einer unzureichenden Wirkstoffkonzentrationen der AE im Gehirn aus (LÖSCHER u. POTSCHKA 2005c; POTSCHKA 2010b).

Die Transporter Pgp, BCRP und MRP2 sind aufgrund ihrer Lokalisation an der BHS in die verringerte Gehirngängigkeit vieler Wirkstoffe involviert (LÖSCHER u. POTSCHKA 2005a). Tishler et al. konnte 1995 durch den Nachweis einer vermehrten Expression von MDR1 bei Patienten mit pharmakoresistenter Epilepsie mittels PCR den Grundstein zur Formulierung der Transporter-Hypothese legen. Dies lieferte einen neuen Ansatz zur Erklärung der Pharmakoresistenz (TISHLER et al. 1995; LÖSCHER u. LANGER 2010), der in den darauffolgenden Jahren anhand weiterer Studien bestätigt werden konnte (LAZAROWSKI et al. 2004; KUBOTA et al. 2006; AK et al. 2007).

Bei Patienten mit pharmakoresistenter Epilepsie kommt es an kapillären Endothelzellen im epileptischen Gewebe zu einer vermehrten Expression von Pgp (TISHLER et al. 1995; DOMBROWSKI et al. 2001; SISODIYA et al. 2002; ARONICA et al. 2004; LAZAROWSKI et al. 2004; KUBOTA et al. 2006; AK et al. 2007). Diese Überexpression ist mit hoher Wahr-

scheinlichkeit auf den epileptischen Fokus im Gehirn beschränkt, da sie im gesunden anliegenden Gewebe nicht nachweisbar ist (SISODIYA et al. 2002; LÖSCHER u. POTSCHKA 2005a). Auch im Gehirngewebe epileptischer Hunde konnten in Endothelzellen erhöhte Expressionsraten des Transporters Pgp festgestellt werden (PEKCEC et al. 2009b). Neben Pgp sind auch einige Transporter der MRP-Familie wie MRP1, MRP2, MRP5 und MRP6 im epileptischen Gehirn vermehrt exprimiert (DOMBROWSKI et al. 2001; ARONICA et al. 2005; KUBOTA et al. 2006). Die vermehrte Expression dieser Transportsysteme konnte nicht nur in kapillären Endothelzellen, sondern auch in Astrozyten und in dysplastischen Neuronen nachgewiesen werden (SISODIYA et al. 1999; SISODIYA et al. 2002; ARONICA et al. 2003; ARONICA et al. 2004; LAZAROWSKI et al. 2004). Für den Transporter BCRP konnte keine Überexpression im epileptischen Gehirngewebe von Patienten mit pharmakoresistenter Epilepsie festgestellt werden (ARONICA et al. 2005). Die Transporter-Hypothese basiert ferner auf zwei durch weitere Erkenntnisse gestützte Annahmen: Zum einen konnte festgestellt werden, dass die Modulation der Transporter in Tiermodellen die Aufnahme der AE in das Gehirn verbessert (VAN VLIET et al. 2006). Zum anderen konnte in Tiermodellen pharmakoresistenter Epilepsien die Prävention einer anfallsinduzierten erhöhten Transporter-Expression auch die Wirksamkeit von AE verbessern (SCHLICHTIGER et al. 2010).

Der exakte Mechanismus, der bei Epilepsiepatienten zu einer erhöhten Expression der ABC-Transporter in Gehirnkapillaren führt, ist allerdings noch nicht vollständig geklärt. Die Überexpression ist möglicherweise bedingt durch die Auswirkungen der Erkrankung Epilepsie, durch unkontrollierte Anfälle, durch die Folge einer chronischen Therapie mit AE oder durch eine Kombination der genannten Faktoren (LÖSCHER u. POTSCHKA 2005a; POTSCHKA 2010b).

Ein wichtiger Faktor, der eine Überexpression von ABC-Transportern im epileptischen Gehirn bedingt, scheint die Anfallsaktivität zu sein. In einigen tierexperimentellen Studien an Nagern konnte gezeigt werden, dass die Anfallsaktivität eine vermehrte Expression von Pgp zur Folge hat (RIZZI et al. 2002; SEEGER et al. 2002a, c; VAN VLIET et al. 2004; VOLK et al. 2005; LIU et al. 2007b). Weitere In-vivo-Studien weisen darauf hin, dass die Anfallsaktivität zudem BCRP, MRP1 und MRP2 hochreguliert (VAN VLIET et al. 2005; HOFFMANN et al. 2006).

Ein zugrundeliegender Mechanismus einer anfallsinduzierten Überexpression der Transporter ist die Arachidonsäurekaskade (BAUER et al. 2008b; PEKCEC et al. 2009a; LUNAMUNGUIA et al. 2015). Während eines epileptischen Anfalls werden hohe Mengen des Neurotransmitters Glutamat ausgeschüttet, der, durch den N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-

Rezeptor vermittelt, die Arachidonsäurekaskade aktiviert. Nach Bindung von Glutamat an den NMDA-Rezeptor kommt es zu einem vermehrten Ca^{2+} -Einstrom. Dadurch wird die Phospholipase A_2 aktiviert, die Arachidonsäure aus der Zellmembran freisetzt. Dies führt zu einer vermehrten Bildung von Prostaglandin H_2 durch das Enzym Zykllooxygenase-2 (COX-2). Das Enzym Prostaglandin-E-Synthase katalysiert die Bildung von Prostaglandin E_2 . Durch den Prostaglandin- E_1 -Rezeptor aktiviert Prostaglandin E_2 weitere Signalfaktoren, woraufhin die Transkription der ABC-Transporter Pgp und MRP2 induziert wird (BAUER et al. 2008b; PEKCEC et al. 2009a; LUNA-MUNGUÍA et al. 2015).

Außerdem beeinflussen sowohl bei der Epilepsie als auch bei anderen ZNS-Erkrankungen, wie z. B. Alzheimer, Multiple Sklerose, Parkinson oder Gehirntumoren, inflammatorische Prozesse die Expression von ABC-Transportern (MILLER et al. 2008; HARTZ u. BAUER 2010). Im Fokus der Studien stehen der Transporter Pgp, die proinflammatorischen Zytokine *tumor necrosis factor alpha* (TNF α), IL-1 β , IL-6, *Interferon- γ* (IFN γ) und das Peptidhormon Endothelin. Die Ergebnisse von In-vitro-Studien lieferten anfangs widersprüchliche Aussagen bezüglich der Transportaktivität und der Expression von Pgp nach Exposition mit TNF α , IL-1 β , IL-6, *Interleukin-2* (IL-2) und IFN γ (TAN et al. 2002; THERON et al. 2003; FERNANDEZ et al. 2004; SEELBACH et al. 2007). Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass eine durch Zytokine veränderte Pgp-Expression und Pgp-Transportaktivität von der Zeit, der Dosis und der Lokalisation abhängig sind. Es konnte festgestellt werden, dass die Transportaktivität von Pgp nach einer kurzen Expositionszeit von TNF α verringert, jedoch nach einer langen Expositionszeit von TNF α gesteigert werden kann (HARTZ et al. 2004, 2006; BAUER et al. 2007; YU et al. 2008; PAN et al. 2010).

Oxidativer Stress ist ein weiterer Faktor, der Auswirkungen auf die Regulation der Transporter hat und oft mit Entzündungsreaktionen des Gehirns in Verbindung gebracht wird. Erste Beweise dafür erbrachten Felix et al. (2002), indem sie nach Exposition mit Wasserstoffperoxid auf primäre Gehirnendothelzellen von Ratten eine erhöhte Transportaktivität und eine vermehrte Expression von Pgp, nicht aber von MRP1, beobachteten (FELIX u. BARRAND 2002). Eine Regulation der Proteinexpression von Pgp durch oxidativen Stress konnte anhand einer nachfolgenden Studie an primären Gehirnendothelzellen von Ratten durch Exposition mit Kinasen, die am Wasserstoffperoxid-aktivierenden-Signalweg mitwirken, bestätigt werden (NWAOUZU et al. 2003). Zudem wurde festgestellt, dass Umweltgiftstoffe wie Dieselruß die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies und proinflammatorischer Zytokine begünstigen. An isolierten Gehirnkapillaren von Ratten konnte sowohl die Proteinexpression als auch die funktionale Aktivität von Pgp durch Exposition mit Dieselruß erhöht werden (HARTZ et

al. 2008). Eine In-vitro- sowie eine In-vivo-Studie erbrachten zudem den Nachweis einer vermehrten Expression und einer erhöhten Transportfunktion von Pgp an der BHS infolge chronisch oxidativen Stresses durch Glutathion (HONG et al. 2006; WU et al. 2009).

Ein weiterer kontrovers diskutierter, aber aus therapeutischer Sicht bedeutsamer Faktor, der einen Einfluss auf eine vermehrte Expression von ABC-Transportern an der BHS haben könnte, ist deren Induktion durch AE selbst. In In-vivo-Studien konnte an Nagern gezeigt werden, dass eine ein- bis zweiwöchige Verabreichung von CBZ, Phenytoin (PHT) und PB keinen induzierenden Effekt auf den Transporter Pgp hatte (RIZZI et al. 2002; SEEGER et al. 2002b). Eine dreiwöchige Applikation dieser AE führte jedoch zu einer Überexpression von Pgp in Gehirnkapillaren von Ratten (WEN et al. 2008). Zudem wurde in einer In-vitro-Studie an isolierten Gehirnkapillaren von Ratten und Mäusen nachgewiesen, dass PB in einer Konzentration von 1 mM einen signifikanten Anstieg der Transportaktivität sowie der Proteinexpression von Pgp, MRP2 und BCRP innerhalb von einer bis vier Stunden zur Folge hatte (WANG et al. 2010). Unter Verwendung von endothelialen kapillären Zelllinien konnte keine vermehrte Transportaktivität von Pgp durch eine Exposition mit PB, TPM, PHT, Tiagabin (TGB) und Levetiracetam (LEV) im Rahmen ihrer therapeutisch wirksamen Plasmakonzentration festgestellt werden. Lediglich CBZ erhöhte die Pgp-Transportaktivität (ALMS et al. 2014).

Basierend auf der Transporter-Hypothese könnte eine vermehrte Expression von ABC-Transportern an der BHS, abhängig von den Substrateigenschaften der AE, in einer reduzierten Gehirngängigkeit dieser AE resultieren. Dies könnte zur Ausbildung einer Pharmakoresistenz beitragen (SISODIYA 2003; LÖSCHER u. POTSCHKA 2005b). Im Fokus der Entwicklung neuartiger Medikamente stehen demnach unter anderem Substanzen, die nicht als Substrate von ABC-Transportern fungieren und die zur Modulation der Transportaktivität fähig sind (LÖSCHER u. POTSCHKA 2005a).

4.3. *Intrinsic-severity-Hypothese*

Laut epidemiologischer Daten äußert sich der Schweregrad von Epilepsien in der unterschiedlichen Anfallsfrequenz zu Beginn einer Epilepsieerkrankung. Eine hohe Anfallsfrequenz beeinflusst das individuelle Ansprechen eines Patienten auf eine medikamentöse Behandlung negativ.

Aufgrund dieser Beobachtungen lieferten Rogawski und Johnson 2008 mit der *Intrinsic-severity*-Hypothese eine weitere Erklärung zur Entstehung der Pharmakoresistenz und stellten sowohl die *Target*-Hypothese als auch die Transporter-Hypothese in Frage.

Sie gehen davon aus, dass molekulare und pathophysiologische Veränderungen eine Verschlechterung der Epilepsieerkrankung zur Folge haben und die Wahrscheinlichkeit eines Therapieerfolges negativ beeinflussen (ROGAWSKI u. JOHNSON 2008).

4.4. Strategien zur Überwindung der Pharmakoresistenz

Experten diskutieren unterschiedliche Ansätze zur Überwindung einer ABC-Transporterbedingten pharmakoresistenten Epilepsie.

Im Falle einer bereits vorhandenen Pharmakoresistenz könnte durch Modulation der ABC-Transporter die Funktion der Transportsysteme deaktiviert werden. Darunter wird in diesem Zusammenhang eine direkte Hemmung durch kompetitive Substanzen sowie eine funktionelle oder transkriptionelle Hemmung des Transporters Pgp verstanden. Da Pgp einen entscheidenden Einfluss auf den Auswärtstransport von AE an der BHS hat, steht dieser Transporter im Fokus der Forschung. Die Modulation von Pgp führt zu einer verringerten Pgp-Transporterfunktion und erhöht dadurch die Gehirnpermeabilität von Pgp-Substraten (BAUER et al. 2005). Die Einteilung der Pgp-Modulatoren erfolgt nach Selektivität. Bisher ergeben sich daraus drei Generationen von Pgp-Modulatoren. Zu den Modulatoren der ersten Generation zählen Substanzen wie beispielsweise Verapamil, Chinidin und Cylosporin A. Aufgrund ihrer relativ geringen Affinität zu Pgp müssen sie in einer hohen Dosierung verabreicht werden. Dies führt im Körper zu einem inakzeptablen toxischen Effekt (FERRY et al. 1996; KRISHNA u. MAYER 2000; THOMAS u. COLEY 2003). Die Modulatoren der zweiten Generation stellen Strukturanaloga dieser Substanzen dar (POTSCHKA 2010c). Allerdings inhibieren diese Substanzen zusätzlich Zytochrom-P450-Enzyme, was zu einer erhöhten systemischen Exposition vieler zytotoxischer Substanzen führt (FISCHER et al. 1998; WANDEL et al. 1999). Zu den Modulatoren der dritten Generation zählen Tariquidar, Laniquidar, Zosuquidar und Elacridar. Sie haben eine höhere Selektivität und eine bessere Wirksamkeit (BATES et al. 2002; THOMAS u. COLEY 2003). Tariquidar und Elacridar modulieren zudem den ABC-Transporter BCRP (PICK et al. 2008; KUHNLE et al. 2009). Bei der Auswahl ist zu berücksichtigen, dass Pgp eine Funktion bei der Verteilung endogener Substanzen und beim Schutz des Körpers vor schädlichen Xenobiotika hat. Deshalb sollte der Gebrauch von Modulatoren der dritten Generation vorsichtig und in kurzen Behandlungsintervallen eingesetzt werden (POTSCHKA u. LUNA-MUNGUIA 2014).

Neben der Möglichkeit der direkten Transporter-Modulation kann auch eine indirekte Modulation der Transporter erfolgen, indem auf Transporter-kontrollierende Signalkaskaden eingewirkt wird. Eine dieser Signalkaskaden ist die Arachidonsäurekaskade. Ein möglicher An-

griffspunkt der Arachidonsäurekaskade ist die Hemmung von COX-2. Es konnte in unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass eine anfallsbedingte Hochregulierung von Pgp durch die Verabreichung des COX-2-Hemmers Celecoxib und des spezifischen Prostaglandin-E1-Rezeptor-Hemmers SC-51089 verhindert werden kann (PEKCEC et al. 2009a; ZIBELL et al. 2009). Außerdem konnte eine bestehende Pharmakoresistenz gegenüber PB nach sechstägiger Vorbehandlung mit Celecoxib überwunden werden (SCHLICHTIGER et al. 2010). Im Gegensatz zu einer effektiven Hemmung der anfallsbedingten Überexpression von Pgp durch Celecoxib haben Zyklooxygenase-1 (COX-1)-Hemmer keinen Einfluss auf die Proteinexpression (POTSCHKA u. LUNA-MUNGUÍA 2014).

Neben der Möglichkeit, in den Ablauf der Arachidonsäurekaskade durch Hemmung von COX-2 einzugreifen, kann durch Modulation des NMDA-Rezeptors mit dem Rezeptorblocker MK-801 die Induktion der Arachidonsäurekaskade von vornherein verhindert werden (BAUER et al. 2008b).

Eine weitere therapeutische Strategie zur Überwindung der Pharmakoresistenz ist die „Verpackung“ der ABC-Transporter-Substrate in Nanopartikel (KREUTER 2001). Der Vorteil liegt in der Erhaltung der protektiven Funktion der Transportsysteme. Bislang sind zur Überprüfung dieser Strategie nur wenige Studien durchgeführt worden. Lediglich für das AE Valproat (VPA) konnte festgestellt werden, dass sich die Pharmakokinetik durch dessen Verkapselung nicht verändert (DARIUS et al. 2000; POTSCHKA 2010c).

5. Antiepileptika

Die klassische Therapie von Epilepsien besteht nach wie vor in einer Unterdrückung epileptischer Anfälle durch eine Pharmakotherapie. Sie erfolgt symptomatisch durch eine kontinuierliche Applikation mit AE (LÖSCHER et al. 2006). Seit die antikonvulsiven Eigenschaften von Bromiden und PB entdeckt wurden, konnten bis heute mehr als 20 AE zugelassen werden (LÖSCHER u. SCHMIDT 2011).

Allerdings können die verfügbaren AE bei 20-40 % der an Epilepsie erkrankten Hunde (SCHWARTZ-PORSCHKE et al. 1985; LOSCHER 2003; POTSCHKA et al. 2015) und bei mehr als 30 % der humanmedizinischen Patienten (KWAN u. BRODIE 2000) das Auftreten von Anfällen nicht verhindern. Aufgrund der sowohl in der Tier- als auch in der Humanmedizin hohen Zahl an Patienten mit pharmakoresistenter Epilepsie besteht ein erheblicher Bedarf an neuen Wirkstoffen, die klinische Vorteile gegenüber den bisherigen Wirkstoffen besitzen (POTSCHKA et al. 2013).

Im Vergleich zu der großen Auswahl zugelassener AE in der Humanmedizin ist die Anzahl der in der Tiermedizin verfügbaren AE sehr viel kleiner. Für eine effektive Behandlung von Epilepsien ist ein kontinuierlich aufrechtzuerhaltender therapeutischer Plasmaspiegel von entscheidender Bedeutung. Deshalb ist beim Hund die rasche Metabolisierung vieler humanmedizinischer AE sowie deren Nebenwirkungen der Grund für die limitierte Auswahl eines geeigneten therapeutisch wirksamen Medikaments. Bei der Katze hingegen fehlen pharmakokinetische Daten der verschiedenen AE sowie die klinische Erfahrung bei der Anwendung (LÖSCHER et al. 2006; ALTHAUS u. FREY 2007). PB und Kaliumbromid stellen die beiden gebräuchlichsten AE in der Tiermedizin dar, wobei Kaliumbromid meist als Zusatz zu einer Monotherapie mit PB eingesetzt wird (BAGLEY 2005). Imepitoin ist ein neues, von der Europäischen Union zur Behandlung der caninen idiopathischen Epilepsie zugelassenes AE (RUNDFELDT et al. 2014; RUNDFELDT u. LOSCHER 2014).

Obwohl AE klinisch primär für die Behandlung von Epilepsien verwendet werden, finden sie in der Humanmedizin auch Anwendung in der Behandlung von Migräne, neuropathischen Schmerzen, bipolaren affektiven Störungen, Tremor, Myotonie, Dystonie, Angstzuständen, Schizophrenie, *Restless-Legs-Syndrom*, sozialer Phobie, posttraumatischen Belastungsstörungen sowie Alkoholabhängigkeit und -entzug (ROGAWSKI u. LÖSCHER 2004).

In der vorliegenden Studie wird der Einfluss der AE PB, CBZ und TPM auf die Regulation von ABC-Transportern geprüft. Die verwendeten AE werden im Folgenden näher betrachtet.

5.1. Phenobarbital

Das in der Veterinärmedizin gebräuchlichste AE ist 5-Ethyl-5-phenyl-barbitursäure (Phenobarbital, PB). Es zählt zu der Gruppe der Barbiturate und wurde erstmals im Jahr 1912 von dem deutschen Chemiker Emil Fischer synthetisiert. Die anfallssuppressive Wirkung von PB wurde von dem deutschen Neurologen und Psychiater A. Hauptmann im selben Jahr entdeckt (HAUPTMANN 1912; KRÄMER 2012). In Entwicklungsländern ist PB bis heute das am meisten eingesetzte AE und auch in Industrieländern wird es nach wie vor zur Behandlung von Epilepsien eingesetzt. PB ist zur Monotherapie und Zusatzbehandlung von Epilepsien mit fokalen und generalisierten Anfällen zugelassen. Es wird von der Weltgesundheitsorganisation als erste Wahl zur Behandlung von partiellen und generalisierten tonisch-klonischen Anfällen in Entwicklungsländern empfohlen (KWAN u. BRODIE 2004). In der Veterinärmedizin ist PB bei Hunden und Katzen zur Behandlung von fokalen und generalisierten Anfällen unter dem Warenzeichen Phenoleptil und Luminal vet. in Form von Tabletten zugelassen (LÖSCHER et al. 2006).

PB wirkt vorwiegend über die Verstärkung der durch den γ -Aminobuttersäure (GABA)-Rezeptor-vermittelten postsynaptischen Chloridströme. Dies führt zu einer verlängerten Öffnung des GABA-Rezeptor-assoziierten Chloridkanals. Somit vermittelt PB eine Verstärkung der hemmenden Neurotransmitterfunktion. Außerdem wirkt es über die Abschwächung präsynaptischer calciumabhängiger Potentiale und postsynaptischer kaliumabhängiger Potentiale durch Antagonisierung von Aminomethylphosphonsäure (AMPA)-Rezeptoren. AMPA-Rezeptoren stellen als Kationenkanäle eine Untergruppe der Glutamaterezeptoren dar (LÖSCHER et al. 2006).

5.2. Carbamazepin

5H-Dibenz(b, f)azepin-5-carboxamid (Carbamazepin, CBZ) wurde 1957 synthetisiert. Als AE wurde CBZ zum ersten Mal 1960 eingesetzt (MÜLLER 1963; HAGEN u. RIGHTER 1964; JONGMANS 1964; DREYER 1965; KRÄMER 2012).

CBZ wird als Mittel der ersten Wahl zur Behandlung fokaler und sekundär generalisierter tonisch-klonischer Anfälle verwendet. Es besitzt neben einer antiepileptogenen auch eine antipsychotische Wirkung und ist in der Humanmedizin auch zur Behandlung von Trigeminusneuralgien zugelassen. In der Veterinärmedizin spielt CBZ als AE aufgrund seiner kurzen Halbwertszeit beim Hund und der fehlenden klinischen Erfahrung bei der Katze keine Rolle (LÖSCHER et al. 2006).

Die Wirkung erfolgt in erster Linie über die Blockade spannungsabhängiger Natriumkanäle,

deren Inaktivierung nach der Depolarisation verlängert wird. Neben der postsynaptischen Wirkung konnte auch eine präsynaptische Wirkung auf Natriumkanäle nachgewiesen werden, die zu einer Reduktion der synaptischen Übertragung führt. Dadurch kommt es zu einer Verminderung des spannungsabhängigen Calciumflusses und somit zur Inhibition der postsynaptischen Übertragung (FRÖSCHER et al. 2004; SCHMIDT u. ELGER 2004; KRÄMER 2012).

5.3. Topiramat

2,3:4,5-di-O-isopropyliden- β -D-fructo-pyranose-sulfamat (Topiramat, TPM) leitet sich von dem Monosaccharid D-Fruktose (2,3:4,5-Bis-o-(1-methylethyliden)-d-fructopyranosyl-sulfamat) ab (BAUER u. SCHWALEN 2000). Es ist in Deutschland seit 1998 als Zusatzmedikament zur Behandlung von pharmakoresistenten fokalen und sekundär generalisierten Anfällen zugelassen. Darüber hinaus wird es beispielsweise auch in der Behandlung von *Cluster*-Kopfschmerzen eingesetzt (MAY et al. 2005) und könnte zudem eine vielversprechende Therapieoption bei Alkoholabhängigkeit darstellen (ARBAIZAR et al. 2010). In der Veterinärmedizin ist TPM für die Therapie epileptischer Hunde wegen seiner kurzen Halbwertszeit weniger geeignet. Allerdings kann TPM in einer therapeutischen Dosis von 5-10 mg/kg alle 8-12 Stunden in einer Kombinationstherapie beim Hund mit pharmakoresistenter Epilepsie eingesetzt werden (VOLK u. LODERSTEDT 2011). Klinische Erfahrungen zur Behandlung epileptischer Katzen mit TPM liegen nicht vor (LÖSCHER et al. 2006).

Der Wirkmechanismus beruht auf der Modulation spannungsabhängiger Natrium- und Calciumkanäle. Zudem ist eine Verstärkung der GABA-vermittelten, hemmenden Neurotransmission und der Hemmung der exzitatorischen Neurotransmission durch die Blockierung der Subtypen von Glutamatrezeptoren (AMPA- und Kainat-Rezeptor) beschrieben (BAUER u. SCHWALEN 2000; ROGAWSKI u. LOSCHER 2004; KRÄMER 2012; FISCHER et al. 2013).

6. Proteomik

Der Begriff „Proteom“ definiert die Zusammensetzung der Gesamtheit aller Proteine, die von dem Genom codiert werden (WILKINS et al. 1996). Die Proteomik beschäftigt sich mit der Funktion aller exprimierten Proteine (TYERS u. MANN 2003). Entscheidend ist dabei die Identifizierung der Proteine einer biologischen Probe unter vorgegebenen Bedingungen zum Zeitpunkt der Untersuchung (ALZATE 2010). Die Proteomik befasst sich nicht nur mit Proteinen irgendeiner bestimmten Zelle, sondern auch mit dem Vorkommen aller Proteinisoformen und –modifikationen, der Interaktion zwischen ihnen, der strukturellen Beschreibung der Proteine sowie mit fast allen postgenomischen Prozessen. Sowohl durch translationale Modifikationen, wie Acetylierung, Phosphorylierung, Ubiquinierung und Glykosylierung, als auch durch alternatives Spleißen ergeben sich viele verschiedene, in mehreren chemischen Formen vorkommende Proteine (TYERS u. MANN 2003). Man geht davon aus, dass dadurch 20.000–25.000 Gene einer typischen Säugerzelle 1.000.000 verschiedene reife Proteine codieren (INTERNATIONAL HUMAN GENOME SEQUENCING 2004). Außerdem können die Struktur und die Funktion der Proteine durch Umweltfaktoren, wie z.B. der Temperatur, der Ionenstärke und des pH-Werts, moduliert werden (CREIGHTON 1993).

Eine Fehlregulierung der Proteinexpression kann zu pathologischen Zuständen wie Tumoren, neurodegenerativen Erkrankungen und metabolischen Störungen führen. Deshalb ist für das physiologische und pathologische Verständnis der molekularen zellulären Prozesse die Identifikation, Quantifizierung und Charakterisierung der Proteine einer Zelle von grundlegender Bedeutung (SCHMIDT et al. 2014). Das Ziel der Proteomik besteht in der Erforschung des komplexen Zusammenspiels biologischer Vorgänge und der pathologischen Abweichung bei Krankheiten, basierend auf den von Zellen erzeugten Proteinen (THIEMAN et al. 2007). Die Proteomik beruht auf biochemischen und biophysikalischen Prinzipien, setzt bei der Analyse der erhobenen Daten aber auch Kenntnisse im Bereich der Bioinformatik voraus (ROCHA u. CAVALHEIRO 2014).

6.1. Neuroproteomik

Die Neuroproteomik ist ein Teilgebiet der Proteomik. Im Gegensatz zur Proteomik, die sich mit Fragestellungen des Gesamtorganismus beschäftigt, setzt sich die Neuroproteomik lediglich mit dem Proteom von ZNS-spezifischem Gewebe oder einzelnen kultivierten oder isolierten Zellen des Gehirns auseinander (ALZATE 2010). Die Neuroproteomik bietet die Möglichkeit, die Erforschung und die Entwicklung wichtiger Biomarker sowie das Verständnis

über pathophysiologische Mechanismen neurodegenerativer Erkrankungen voranzutreiben. Im Bereich der Epilepsieforschung wird die Neuroproteomik unter anderem dazu genutzt, neue Therapiestrukturen zu identifizieren, die dazu beitragen Therapiestrategien zu entwickeln, die epileptische Anfälle unterdrücken oder präventiv in den epileptogenen Prozess eingreifen können. So ist es mithilfe proteomischer Techniken inzwischen möglich, differentiell exprimierte Proteine aus Gehirngewebe oder zerebrospinaler Flüssigkeit zu identifizieren und im Hinblick auf Proteinmodifikationen zu untersuchen (ROCHA u. CAVALHEIRO 2014).

7. Angiogenese im Gehirn

In den letzten Jahren konnte der Beweis erbracht werden, dass eine Dysfunktion der BHS in der Pathophysiologie zahlreicher ZNS-Erkrankungen eine wichtige Rolle spielt und zur Epileptogenese beitragen kann (ABBOTT et al. 2010; MARCHI u. LERNER-NATOLI 2013). Zudem konnte sowohl klinisch als auch experimentell ein direkter Zusammenhang zwischen einer dysfunktionalen BHS und epileptischen Anfällen gezeigt werden (TOMKINS et al. 2011; LIBRIZZI et al. 2012).

Die Zellen der BHS reagieren dabei auf verschiedene pathologische und rheologische Signale, die zur Stimulation der Angiogenese und zur vaskulären Remodellierung führen (ABBOTT et al. 2010). Die vermehrte Vaskularisierung geht einher mit dem Verlust sowie dem Übertritt von Tight-Junction-Proteinen [z. B. TJP1, TJP2, *junctional adhesion molecule C* (JAM3)] und Serumproteinen in das Gehirnparenchym. Dies führt zu einer erhöhten Permeabilität der BHS (VAN VLIET et al. 2007a). Dadurch entsteht ein Circulus vitiosus: Eine Dysfunktion der BHS kann zu vermehrten epileptischen Anfällen führen, was wiederum durch eine andauernde Anfallsaktivität den Schaden an der BHS vergrößert und in weiteren epileptischen Anfällen resultieren kann (MARCHI u. LERNER-NATOLI 2013).

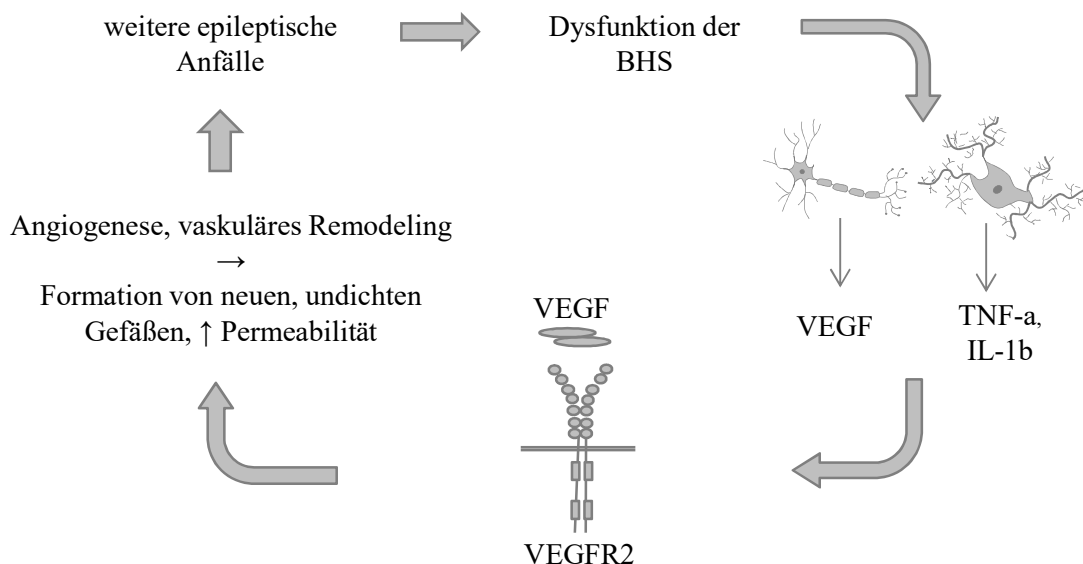


Abbildung 7: Circulus vitiosus: Eine Dysfunktion der Blut-Hirn-Schranke (BHS) führt zur Freisetzung von *vascular endothelial growth factor* (VEGF) und proinflammatorischen Zytokinen durch Neuronen und Mikroglia. VEGF vermittelt seine Wirkung über den Rezeptor *vascular endothelial growth factor receptor 2* (VEGFR2) an Endothelzellen der BHS. Dies fördert die Angiogenese und erhöht dadurch die Permeabilität der BHS, was in weiteren epileptischen Anfällen resultieren kann (MARCHI u. LERNER-NATOLI 2013). TNF- α = Tumornekrosefaktor α , IL-1b = Interleukin-1 β .

Morphologische Veränderungen im epileptischen Fokus könnten auf das Auftreten angiogenetischer Prozesse hinweisen. In Patienten mit TLE konnten in hohem Maße der Wachstumsfaktor *vascular endothelial growth factor* (VEGF) in Neuronen und Astrozyten und die Überexpression des Tyrosinkinaserzeptors *vascular endothelial growth factor receptor 2* (VEGFR-2) in Endothelzellen der BHS nachgewiesen werden (RIGAU et al. 2007). VEGF wird bei Entzündungen und Hypoxie durch Transkriptionsfaktoren wie dem *activator protein 1* (AP-1), dem *hypoxia-inducible factor 1 α* (HIF1A), dem *signal transducer and activator of transcription 3* (STAT3) und dem *Sp1 transcription factor* (Sp-1) reguliert. Diese Transkriptionsfaktoren wie auch VEGFR-2 werden bei epileptischen Anfällen freigesetzt. Die darauf folgende Induktion der VEGFR-2-Signalkaskade kontrolliert die vaskuläre Permeabilität und das endotheliale Zellwachstum. VEGFR-2 aktiviert *inositol trisphosphate 3* (IP3), *endothelial nitric oxide synthase* (eNOS) und *phospholipase C* (PLC), die die Proteolyse der vaskulären Basalmembran durch *matrix metalloproteinase-2* (MMP-2), *matrix metalloproteinase-9* (MMP-9), Heparinasen und Plasminogen induziert. PLC und *p42/44 mitogen-activated protein kinase* (P42/44-MAP-Kinase) fördern die Proliferation und Migration der Endothelialzellen. Die Aktivierung von *proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src* (SRC), *phosphoinositide 3-kinase* (PI3K) und *p38 mitogen-activated protein kinase* (p38-MAP-Kinase) führt zu einer Beschädigung von interendothelialen Junctions und der Migration von Endothelzellen (MORIN-BRUREAU et al. 2012; MARCHI u. LERNER-NATOLI 2013).

Der beschriebene proangiogenetische Signalweg von VEGF ist in Abbildung 8 dargestellt.

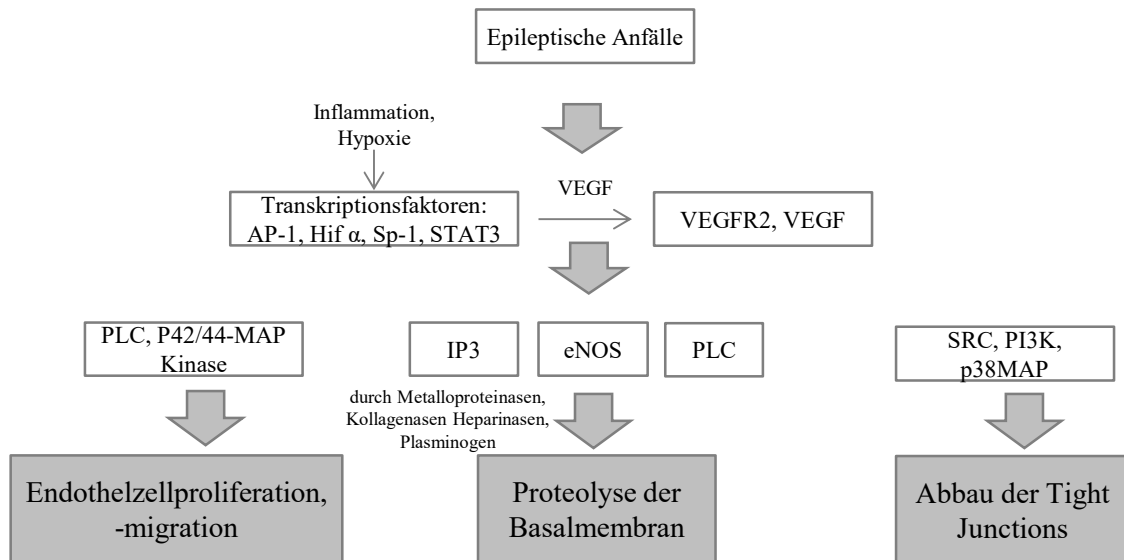


Abbildung 8: Proangiogenetischer Signalweg von VEGF (*vascular endothelial growth factor*). Hypoxische oder entzündliche Zustände regulieren durch Transkriptionsfaktoren (AP-1, HIF1A, Sp-1 und STAT3) VEGF. Pathologische Bedingungen wie epileptische Anfälle führen zu einer Aktivierung von VEGFR2 (*vascular endothelial growth factor receptor 2*) sowie der genannten Transkriptionsfaktoren. VEGFR2 induziert über verschiedene Signalwege die Endothelzellproliferation, die Proteolyse der vaskulären Basalmembran sowie den Abbau der Tight-Junction-Proteine (MARCHI u. LERNER-NATOLI 2013). AP-1 = *activator protein 1*, HIF1A = *hypoxia-inducible factor 1 α*, Sp-1 = *Sp1 transcription factor*, STAT3 = *signal transducer and activator of transcription 3*, PLC = *Phospholipase*, P42/44-MAP Kinase = *p42/44 mitogen-activated protein kinase*, IP3 = *inositol trisphosphate 3*, eNOS = *endothelial nitric oxide synthase*, PLC = *phospholipase C*, SRC = *proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src*, PI3K = *phosphoinositide 3-kinase*, p38-MAP-Kinase = *p38 mitogen-activated protein kinase*.

Andere angiogenetische Faktoren können die Effekte von VEGF modifizieren. Angiopoetine und ihr Tyrosinrezeptor Tie2 kontrollieren die vaskuläre Permeabilität. Angiopoetin 1, das von Perizyten freigesetzt wird, wirkt als Tie2-Agonist. Es vermittelt über den PI3-K/*protein kinase B* (AKT)-Signalweg den Zellschutz und die Zellreifung. Das von endothelialen Weibel-Palade-Körperchen freigesetzte Angiopoetin 2 ist ein Tie2-Antagonist (MARCHI u. LERNER-NATOLI 2013). Es wirkt, indem es den Effekt von VEGF verstärkt. Während epileptischer Anfälle hat die Überproduktion von VEGF in Neuronen und Gliazellen einen schädlichen Effekt auf die Permeabilität der BHS. Zudem kann aber auch eine positive Wirkung auf das Überleben von Neuronen ausgeübt werden (HOLMES et al. 2007).

Eine Vielzahl von Proteinen konnte identifiziert werden, die den VEGF-Signalweg in unterschiedlichen Geweben im Körper regulieren. Dazu zählen unter anderem die Proteine *growth factor receptor-bound protein 2* (GRB2), *adapter molecule crk* (CRK), *annexin A1* (ANXA1), *annexin A2* (ANXA2), *cell division cycle protein 42* (CDC42) und *ras-related protein Rab-5A* (RAB5A) (SORIANO et al. 2004; STOLETOV et al. 2004; JOPLING et al. 2009b; ZHAO et al. 2010; PIN et al. 2012; JIN et al. 2013a). Verschiedene Proteine wie *talin-1* (TLN1), *integrin alpha-1* (ITGA1), *cell surface glycoprotein MUC18* (MCAM) und *lipid phosphate*

phosphohydrolase 3 (PPAP2B) sind in die Zelladhäsion sowie in die Zell-Zell-Interaktionen während der Angiogenese involviert (WARY u. HUMTSOE 2005; AVRAAMIDES et al. 2008; CRITCHLEY 2009; MONKLEY et al. 2011; WANG u. YAN 2013).

Für das vorliegende Projekt von besonderem Interesse sind Proteine, die durch den Einfluss angiogenetischer Prozesse während der Epileptogenese die Integrität der BHS beeinflussen.

III. ARBEITSHYPOTHESEN UND ZIELSETZUNG

1. Regulation von ABC-Transportern durch Antiepileptika

Etwa ein Drittel der veterinär- und humanmedizinischen Epilepsiepatienten leiden an therapeutisch nicht kontrollierbaren epileptischen Anfällen und leiden daher an einer pharmakoresistenten Epilepsie (KWAN u. BRODIE 2000; LOSCHER 2003; HARTZ u. BAUER 2010). Die Pharmakoresistenz stellt ein großes Problem in der medikamentösen Behandlung von Epilepsien dar. Die pharmakoresistente Epilepsie ist als ein multifaktorielles, komplexes Geschehen anzusehen, dessen zugrundeliegende Mechanismen nicht vollständig geklärt sind. Im Laufe der letzten Jahre haben sich verschiedene Hypothesen zur Erklärung einer pharmakoresistenten Epilepsie herausgebildet (POTSCHKA 2010c). Im Fokus der Forschung steht neben der *Intrinsic-severity*- und der *Target*-Hypothese die Transporter-Hypothese. Die Transporter-Hypothese geht davon aus, dass eine Überexpression von ABC-Transportern einer therapeutisch wirksamen Konzentration von AE im Gehirn durch einen verstärkten Auswärtstransport entgegenwirkt (POTSCHKA 2010b). Es gibt Hinweise, dass die Verabreichung von AE die Expression von ABC-Transportern induziert. Jedoch lieferten verschiedene Studien diesbezüglich unterschiedliche Ergebnisse, sodass eine Applikation von AE nicht eindeutig mit einer reduzierten Gehirngängigkeit der AE in Verbindung gebracht werden kann (WEN et al. 2008; WANG et al. 2010; ALMS et al. 2014). Die Erforschung dieser Hypothese ist aus klinischer Sicht besonders relevant, da eine therapeutische Behandlung mit AE selbst, möglicherweise aufgrund einer limitierten Gehirngängigkeit der AE, zur Entstehung einer pharmakoresistenten Epilepsie beitragen könnte. Wang et al. konnten 2010 anhand einer Ex-vivo-Studie an Ratten- und Mäusekapillaren den Nachweis erbringen, dass durch eine Inkubation mit PB sowohl eine vermehrte Expression als auch eine gesteigerte Funktion der Transporter Pgp, BCRP und MRP2 induziert wird (WANG et al. 2010). Allerdings wurden diese Untersuchungen unter Verwendung einer Konzentration weit über der therapeutisch anwendbaren Konzentration von PB durchgeführt. Die Effekte therapeutischer Konzentrationen von AE auf die Expression und die Transportaktivität von ABC-Transportern anhand von Ex-vivo-Versuchen wurden in bisherigen Studien noch nicht untersucht.

In diesem Zusammenhang widmete sich ein Teil meiner Arbeit der Analyse therapeutischer Plasmakonzentrationen von PB, CBZ und TPM auf die Transportaktivität und die Proteinexpression von Pgp, BCRP und MRP 2 an isolierten Schweinekapillaren mit folgenden Kernfragen:

- Wie wirkt sich eine Exposition von endothelialen porcinen Gehirnkapillaren mit den AE PB (170 μM), CBZ (50 μM) und TPM (60 μM) auf die Transportaktivität der ABC-Transporter Pgp, MRP2 und BCRP über die Zeit aus?
- Wie wirkt sich eine Inkubation von endothelialen porcinen Gehirnkapillaren mit den AE PB (170 μM), CBZ (50 μM) und TPM (60 μM) auf die Proteinexpression der Transporter Pgp, BCRP und MRP2 aus?

Diese Studie soll eine klinische Relevanz des Einflusses von AE in therapeutisch relevanten Konzentrationen auf Pgp, BCRP und MRP2 überprüfen. Außerdem soll sie zu einem besseren Verständnis über die Pharmakokinetik von AE und anderen ZNS-Therapeutika beitragen.

2. Proteomanalysen Blut-Hirn-Schranken-assoziierter Proteine während der Epileptogenese

Aus pharmakologischer Sicht hat, neben der Entwicklung antiepileptogener Strategien, die Identifikation geeigneter Biomarker eine besondere klinische Relevanz (HOLTKAMP u. MEIERKORD 2007; ENGEL et al. 2013). Mithilfe von Biomarkern könnten Patienten identifiziert werden, die nach einem Insult eine Epilepsie entwickeln könnten (ENGEL et al. 2013). Die Epileptogenese zeichnet sich durch unterschiedliche pathogene Prozesse aus, die als eine Quelle für potentielle Biomarker angesehen werden (LUKASIUK u. BECKER 2014). Die zugrundeliegenden pathophysiologischen Mechanismen der Epileptogenese sind allerdings noch weitgehend unbekannt (HOLTKAMP u. MEIERKORD 2007). Einige tierexperimentelle und klinische Studien weisen darauf hin, dass epileptische Anfälle in Zusammenhang mit angiogenetischen Prozessen sowie einer erhöhten Permeabilität der BHS stehen, die die Entstehung einer Epilepsie fördern können (JANIGRO 1999; SEIFFERT et al. 2004; HELLSTEN et al. 2005; PAVLOVSKY et al. 2005; OBY u. JANIGRO 2006; IVENS et al. 2007; MARCHI et al. 2007; RIGAU et al. 2007; TOMKINS et al. 2007; VAN VLIET et al. 2007a; TOMKINS et al. 2008). Des Weiteren konnte in In-vivo-Studien festgestellt werden, dass es infolge von epileptischen Anfällen zu einer vermehrten Expression verschiedener ABC-Transporter an der BHS kommt (RIZZI et al. 2002; ZHU u. LIU 2004; VAN VLIET et al. 2005; HOFFMANN et al. 2006; BANKSTAHL et al. 2008). Eine Überexpression von ABC-Transportern ist klinisch sehr bedeutsam, da sie möglicherweise zu einer Resistenzentwicklung gegenüber AE beitragen könnte (POTSCHKA 2010b).

Der zweite Teil dieser Arbeit umfasst die Identifizierung von Proteinen, die während der Epileptogenese in zellulären und molekularen Veränderungen an der BHS involviert sind. Im Rahmen eines vorangegangenen Kooperationsprojektes mit dem Institut für Tierphysiologie der Tierärztlichen Fakultät der LMU und der *Research Unit Protein Science* des Helmholtz-Zentrums München wurde das Proteom des HC und des PHC in einem Tiermodell der Epileptogenese massenspektrometrisch untersucht. Für das Versuchsvorhaben wurde das elektrische Post-SE-Modell an Ratten verwendet. Anschließend erfolgte im Rahmen dieser Studie eine Analyse der Proteindaten beider Gewebe, woraufhin der Nachweis der immunhistochemischen Expression eines regulierten Proteins erfolgte.

Folgende Fragestellungen sollen durch diese Studie beantwortet werden:

- Können spezifische regulierte *pathways* identifiziert werden, die im Zusammenhang mit Angiogenese- und ABC-Transporter-assoziierten Veränderungen an der BHS während der Epileptogenese stehen?
- Können spezifische Angiogenese-assoziierte-, ABC-Transporter- sowie Tight Junction-Proteine während der Epileptogenese identifiziert werden?

Diese Studie soll einen Beitrag zum besseren Verständnis molekularer und zellulärer Mechanismen während der Epileptogenese leisten und darüber hinaus Hinweise für die Identifikation von Biomarkern und pharmakologischen Zielstrukturen liefern.

IV. MATERIAL UND METHODEN

1. Regulation von ABC-Transportern durch Antiepileptika

1.1. Kapillarisolation

Durch die Isolation von Gehirnkapillaren können morphologisch und metabolisch intakte Gehirnkapillaren gewonnen werden, um Ex-vivo-Studien zur Untersuchung der Transportvorgänge an der BHS durchzuführen.

Die Kapillaren wurden aus Gehirnhälften von Schweinen gewonnen. Die Gehirne wurden am Tag des Experiments am Münchner Schlachthof (Münchner Schlachthof Betriebs GmbH, München, Deutschland) frisch geschlachteten, männlichen und weiblichen, ca. sechs Monate alten Schweinen entnommen. Die Schweinegehirne wurden gekühlt transportiert und vor der weiteren Verarbeitung für ca. fünf Minuten mit kaltem Leitungswasser gewaschen. Anschließend wurden sie in eine gekühlte Lösung [103 mM NaCl (Natriumchlorid), 4,7 mM KCl (Kaliumchlorid), 1,2 mM KH_2PO_4 (Kaliumdihydrogenphosphat), 10 mM HEPES [(2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfon-säure), 1,2 mM MgSO_4 (Magnesiumsulfat), 2,5 mM CaCl_2 (Calciumchlorid), pH 7,4; entspricht der Isolationslösung] überführt. Die Meningen wurden von den Gehirnen entfernt. Nachdem die Gehirne mit einem Skalpell grob zerkleinert wurden, erfolgte mithilfe eines Glashomogenisators (Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland) durch zehnmaliges Auf- und Abbewegen eines Pistills (Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland) die Homogenisierung des Gehirngewebes, wobei Kapillarfragmente entstanden. Um die Homogenisierung zu erleichtern, wurde 30%iges Dextran hinzugegeben. Anschließend erfolgte eine Dichtezentrifugation (12 Minuten, 8500 g, 4 °C; Sorvall RC 6+ Zentrifuge, Thermo Scientific, Schwerte, Deutschland). Die Kapillarpellets wurden anschließend mit einer Lösung [Isolationslösung, 10 mM Glukose, 25 mM NaHCO_3 (Natriumhydrogencarbonat) und 1 mM Natriumpyruvat, 5 % bovines Serumalbumin (BSA), pH 7,4] resuspendiert und zur Reinigung durch ein Nylonnetz (Hartenstein, Würzburg Deutschland) mit einer Maschenweite von 210 μm gefiltert. Für eine erneute Reinigung wurde das Kapillargemisch in eine mit Glasperlen gefüllte Säule überführt. Die an den Glasperlen haftenden Kapillaren wurden mit 500 ml BSA-versetzter Isolationslösung gewaschen. Anschließend wurden die Glasperlen vorsichtig aus der Säule entnommen und in einen mit Isolationslösung gefüllten Behälter überführt, wodurch sich die Kapillaren durch vorsichtiges Schütteln des Behälters von den Glasperlen lösen konnten. Danach wurde das Kapillargemisch durch ein Nylonnetz mit einer Maschenweite von 150 μm gefiltert und erneut gereinigt (Hartenstein,

Würzburg Deutschland). Daraufhin erfolgte eine erneute Zentrifugation (12 Minuten, 6500 g, 4 °C; Sorvall RC 6+ Zentrifuge, Thermo Scientific, Schwerte, Deutschland), woraufhin das Kapillarpellet in Inkubationslösung (Isolutionslösung mit 10 mM Glukose; entspricht Kapillarsuspension) gelöst wurde. Die Kapillarsuspension wurde daraufhin für die Analyse der Proteinexpression mittels Western Blot oder zur Untersuchung der Transportvorgänge an Kapillarfragmenten der BHS mittels Transport-Assay verwendet.

Das Schema zum Prozess der Isolation von Kapillaren ist in Abbildung 9 dargestellt.

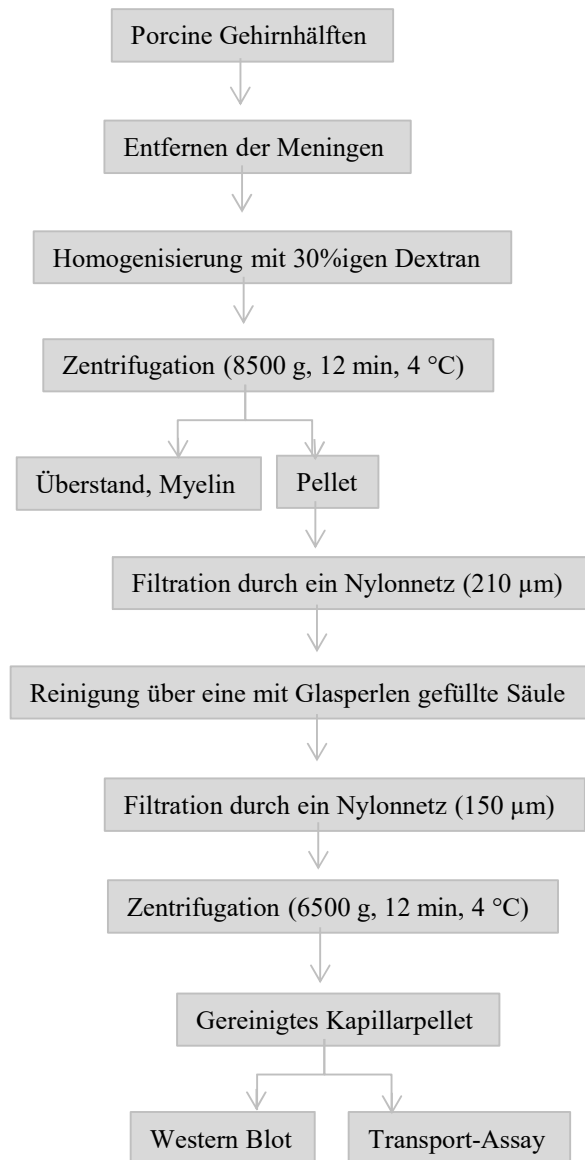


Abbildung 9: Schematische Darstellung des Prozesses einer Isolation von Kapillaren.

1.2. Transport-Assay

Die Transportaktivität der Transporter Pgp, BCRP und MRP2 wurde an Gehirnkapillaren von Schweinen mittels Transport-Assay in jeweils drei Versuchen pro Versuchsansatz ($n = 3$) nachgewiesen. Dafür wurden zunächst 150 μl der Kapillarsuspension (Kapillarpellet mit Inkubationslösung) in die Kammer einer $\mu\text{-Slide}$ -Wellplatte (Ibidi, Martinsried, Deutschland) überführt. Um die Transportaktivität ermitteln zu können, wurde die Kapillarsuspension jeden Ansatzes für eine Stunde mit dem spezifischen Fluoreszenzsubstrat der Transporter inkubiert [NBD-CSA (2 μM) für Pgp, BODIPY-Prazosin (1,5 μM) für BCRP und Texas Red (2 μM) für MRP2)].

Für den Versuch erfolgte eine Inkubation der Kapillarsuspension mit PB (170 μM), CBZ (50 μM) oder TPM (60 μM) für jeweils eine Stunde, drei und fünf Stunden. Zur Ermittlung der Transportaktivität wurde die Kapillarsuspension mit dem spezifischen Fluoreszenzsubstrat inkubiert (Abbildung 10). CBZ wurde in 50 %igem Ethanol und TPM in 100 % DMSO (Dimethylsulfoxid) gelöst (Lösungsmittel entspricht 1:100 in der Kapillarsuspension). PB konnte in der Inkubationslösung gelöst werden, mit der das Kapillarpellet resuspendiert wurde (siehe Kapillarisolation).

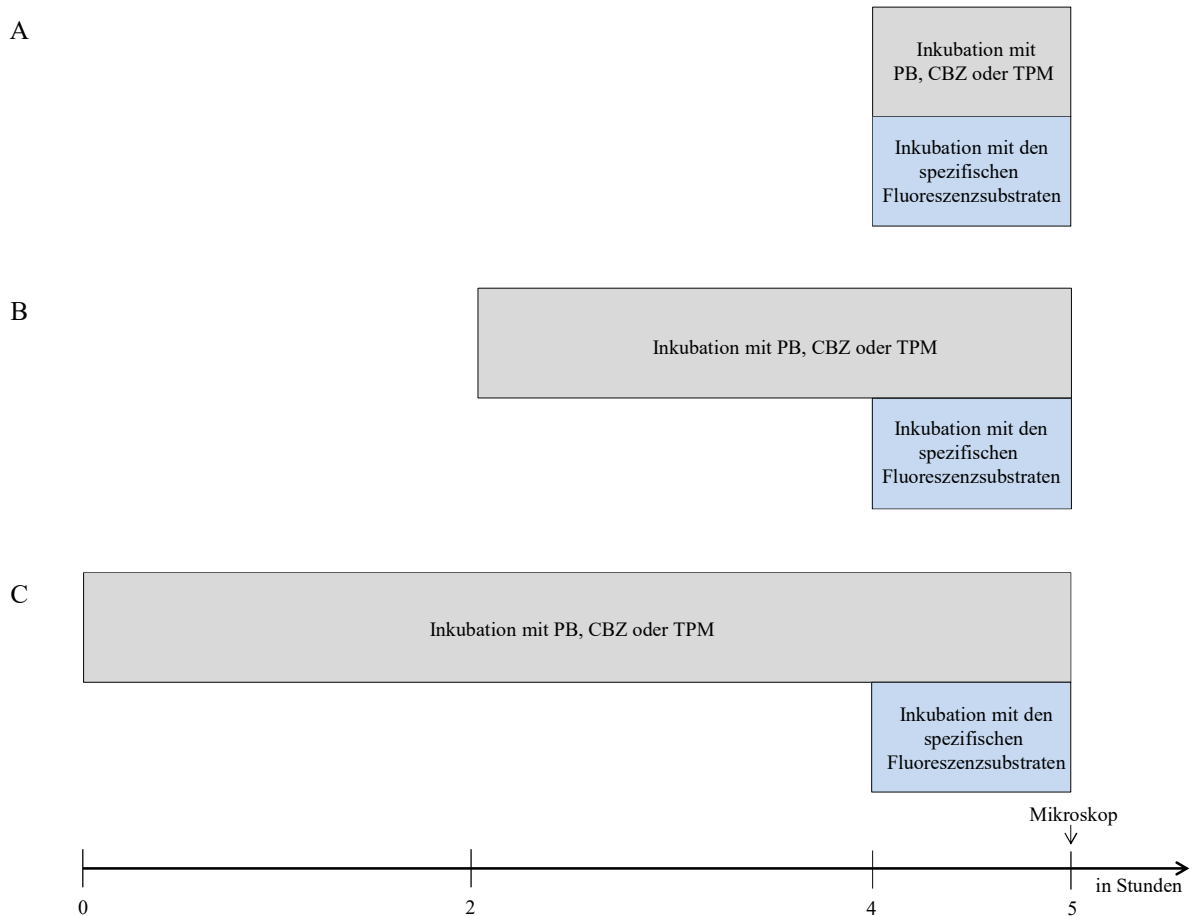


Abbildung 10: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs für den Antiepileptika-Ansatz. Inkubation mit Phenobarbital (PB), Carbamazepin (CBZ) oder Topiramamat (TPM) für eine Stunde (A), drei Stunden (B) und fünf Stunden (C) und mit dem spezifischen Fluoreszenzsubstrat für eine Stunde [NBD-CSA (2 μM) für Pgp, BODIPY-Prazosin (1,5 μM) für BCRP und Texas Red (2 μM) für MRP2].

In dem Kontroll-Ansatz wurde die Kapillarsuspension mit dem spezifischen Fluoreszenzsubstrat der Transporter für eine Stunde inkubiert sowie mit den Lösungsmitteln von CBZ oder TPM für eine, drei und fünf Stunden versetzt (100 % DMSO für TPM, 50 %iger Ethanol für CBZ; Konzentration des Lösungsmittels in der Kapillarsuspension: 1:100; Abbildung 11). Da PB in der Inkubationslösung gelöst werden konnte, war für diesen Kontroll-Ansatz eine Inkubation mit dem Lösungsmittel (Inkubationslösung) nicht notwendig. Dies gilt auch für den Modulator-Ansatz (Abbildung 12). Es erfolgte lediglich eine Inkubation mit dem spezifischen Fluoreszenzsubstrat der Transporter.

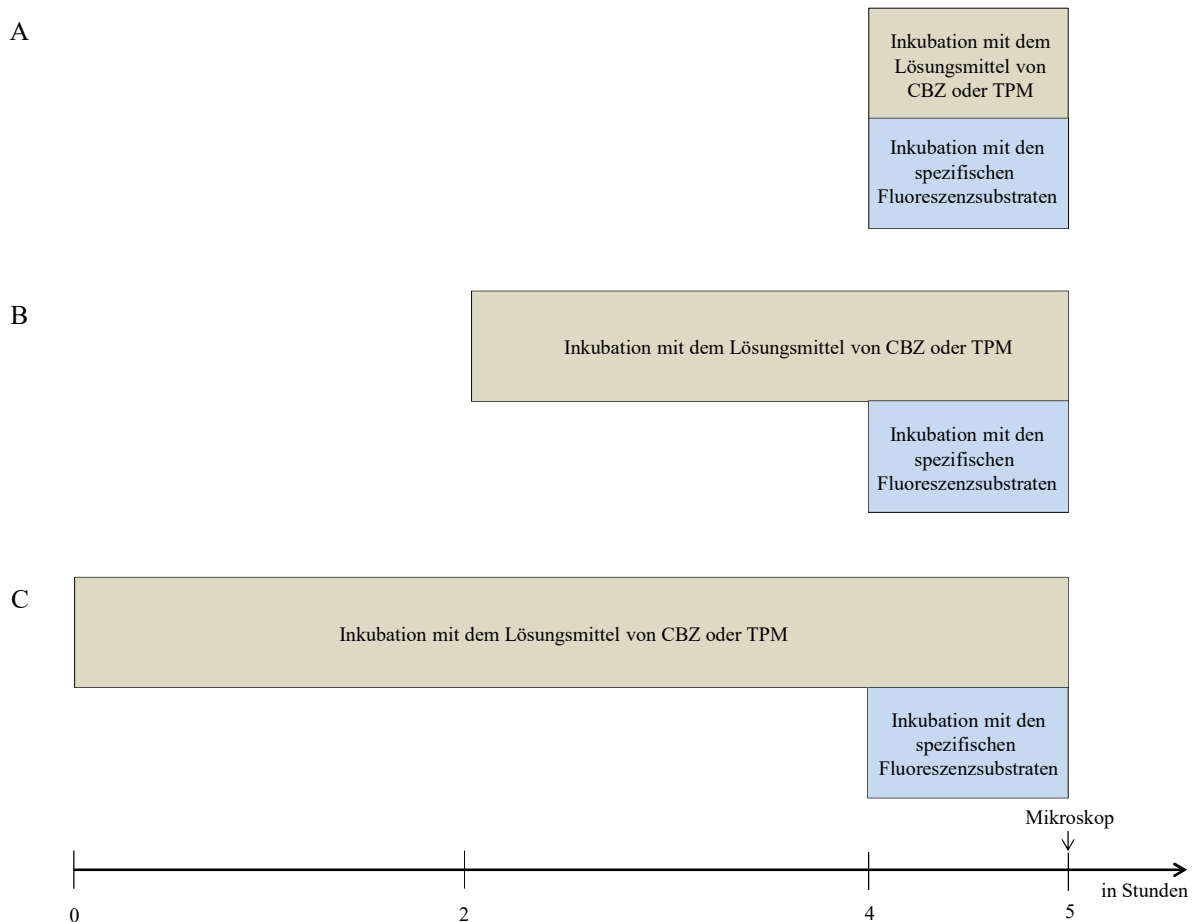


Abbildung 11: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs für den Kontroll-Ansatz. Inkubation mit dem Lösungsmittel von Carbamazepin (CBZ) oder Topiramat (TPM) für eine Stunde (A), drei Stunden (B) und fünf Stunden (C) sowie mit dem spezifischen Fluoreszenzsubstrat für eine Stunde [NBD-CSA (2 μ M) für Pgp, BODIPY-Prazosin (1,5 μ M) für BCRP und Texas Red (2 μ M) für MRP2].

Um die spezifische Substratakkumulation ermitteln zu können (siehe unten), erfolgte außerdem eine Inkubation der Kapillarsuspension mit einem Transporter-spezifischen Modulator. Dazu wurde die Kapillarsuspension für 90 Minuten (30 Minuten vor Inkubation mit dem spezifischen Fluoreszenzsubstrat) mit dem Transporter-spezifischen Modulator inkubiert [PSC-833 (Valspodar; 5 μ M) für Pgp, FTC (Fumitremorgin C; 5 μ M) für BCRP und MK-571 (20 μ M) für MRP2]. Außerdem wurde die Kapillarsuspension mit den Lösungsmitteln von CBZ oder TPM versetzt (100 % DMSO für TPM, 50 %iges Ethanol für CBZ; Konzentration des Lösungsmittels in der Kapillarsuspension: 1:100; Lösungsmittel für PB: Inkubationslösung, deshalb ist eine Inkubation mit dem Lösungsmittel nicht notwendig; Abbildung 12).

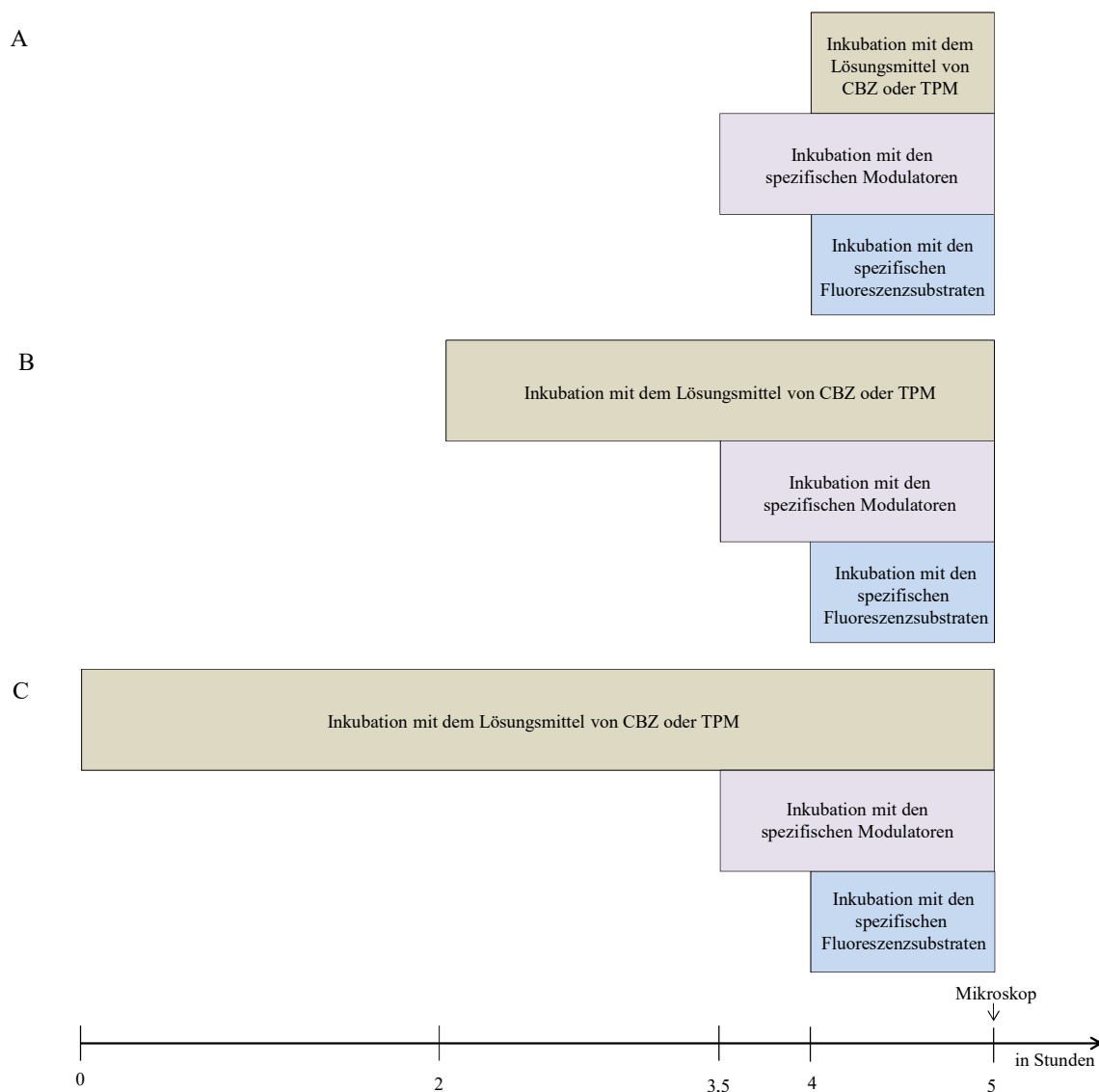


Abbildung 12: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs für den Modulator-Ansatz. Inkubation mit dem Lösungsmittel von Carbamazepin (CBZ) oder Topiramamat (TPM) für eine Stunde (A), drei Stunden (B) und fünf Stunden (C) sowie mit dem spezifischen Fluoreszenzsubstrat für eine Stunde [NBD-CSA (2 μ M) für Pgp, BODIPY-Prazosin (1,5 μ M) für BCRP und Texas Red (2 μ M) für MRP2]. Außerdem wurde die Kapillarsuspension für 1,5 Stunden mit dem Transporter-spezifischen Modulator inkubiert [PSC-833 (5 μ M) für Pgp, FTC (5 μ M) für BCRP und MK-571 (20 μ M) für MRP2].

In Tabelle 1 sind die Transporter-spezifischen Fluoreszenzfarbstoffe und spezifischen Modulatoren aufgeführt.

Transporter	spezifische Fluoreszenz	Hersteller	Modulator	Hersteller
Pgp	NBD-CSA (2 μ M)	Roland Wenger, Heidelberg, Deutschland	PSC-833 (5 μ M)	Tebu-bio GmbH, Offenbach, Deutschland
BCRP	BODIPY-Prazosin (1,5 μ M)	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland	FTC (5 μ M)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, Deutschland
MRP2	Texas Red (2 μ M)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, Deutschland	MK-571 (20 μ M)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, Deutschland

Tabelle 1: Auflistung der spezifischen Fluoreszenzsubstrate und Modulatoren der ABC-Transporter Pgp, BCRP und MRP2.

In Abbildung 13 ist beispielhaft die luminale Texas-Red-Akkumulation in porcinen Gehirnkapillaren unter Kontrollbedingungen, nach einer dreistündigen Inkubation mit PB sowie nach Inkubation mit dem Modulator MK-571 dargestellt.

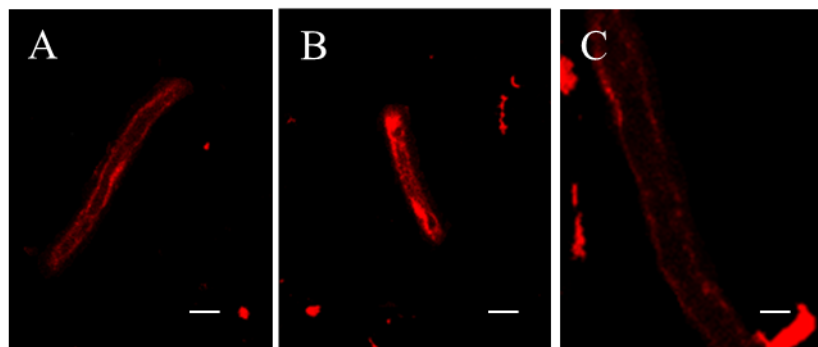


Abbildung 13: Luminale Substratakkumulation von 2 μ M Texas-Red in isolierten porcinen Gehirnkapillaren unter Kontrollbedingungen (A), nach einer dreistündigen Exposition mit 170 μ M Phenobarbital (B) und nach Inkubation mit dem Modulator MK-571 (20 μ M, C). Maßstabsbalken 10 μ m.

Nach den Inkubationszeiten wurden Bilder von zehn bis 15 Kapillarfragmenten pro Ansatz mit einem 40 x 1.2 Wasser-Immersionsobjektiv am konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (Zeiss 510, Carl Zeiss GmbH, Jena, Deutschland) angefertigt. Anschließend wurden die Bilder durch Messung der luminalen Fluoreszenzintensität mit der Software Image J 1.4.3.67 (Launacher Symmetry Software NIH, Bethesda, USA) ausgewertet. Die Auswertung jedes Ansatzes erfolgte anhand zehn verschiedener Kapillarfragmenten. Pro Kapillarfragment wurden jeweils drei verschiedene Stellen analysiert (Abbildung 14).

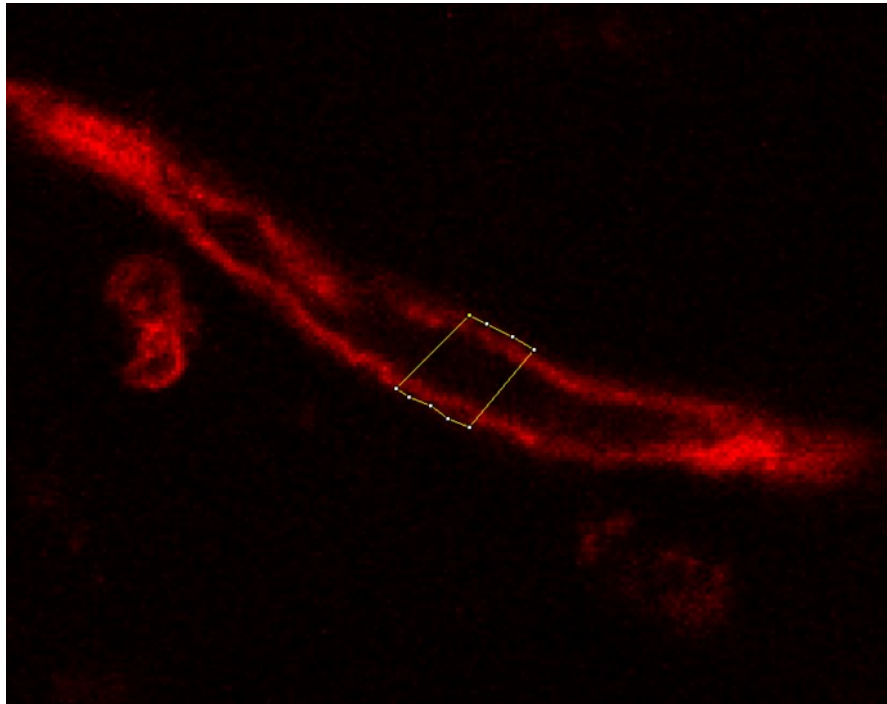


Abbildung 14: Messung der luminalen Texas-Red-Akkumulation mit der Software *Image J* 1.4.3.67. Die Messung erfolgte an drei unterschiedlichen Stellen des Kapillarfragmentes. Pro Ansatz (Kontroll-, Modulator-, Antiepileptikum-Ansatz) wurden zehn Kapillarfragmente ausgewertet.

Die Fluoreszenzakkumulation der Transport-Assay-Versuche wurde in den Ergebnissen der vorliegenden Studien als „spezifische luminal Fluoreszenzakkumulation“ angegeben. Durch die Hemmung des Transports von Pgp, BCRP und MRP2 mit spezifischen Modulatoren der Transporter konnte die luminal Akkumulation, die durch unspezifischen Transport (z. B. Diffusion) verursacht wurde, nachgewiesen werden. Die spezifische luminal Akkumulation wurde durch Subtraktion der luminalen Substratakkumulation des Modulator-Ansatzes von der luminalen Substratakkumulation des Ansatzes der Kontrolle und des AE ermittelt (Bsp. siehe Abbildung 15).

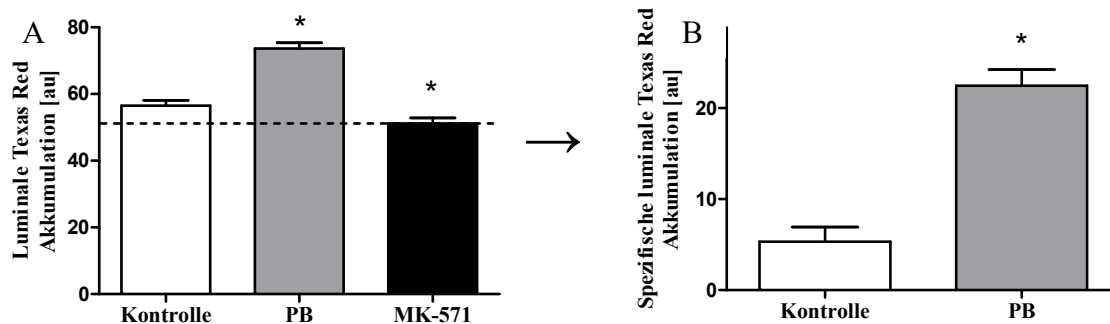


Abbildung 15: Luminaler (A) bzw. spezifische luminaler Texas Red Akkumulation (B) nach dreistündiger Inkubation mit 170 μ M Phenobarbital (PB). Durch Subtraktion der luminalen Substratakkumulation des Modulator-Ansatzes (MK-571) konnte die spezifische luminaler Substratakkumulation des Kontroll- und des Antiepileptikum (PB)-Ansatzes ermittelt werden.

1.3. Western Blot

Der Western Blot ist ein Verfahren zur Übertragung von Proteinen auf eine Trägermembran [Polyvinylidenfluorid (PVDF) oder Nitrocellulose] durch Elektrophorese mit dem Ziel des Proteinnachweises. Dabei wird zunächst das Proteingemisch mittels Gelelektrophorese nach ihrer Größe und Ladung aufgetrennt, woraufhin durch ein Blotting-Verfahren der Transfer dieser Proteine auf eine Trägermembran erfolgt. Die Detektion der Proteine erfolgt mithilfe spezifischer Antikörper.

Der Nachweis der Proteinexpression der Transporter Pgp und BCRP wurde mittels Western Blot durchgeführt. Nach der Kapillarisolation erfolgte eine dreistündige Inkubation der Kapillarsuspension mit PB (170 μ M), CBZ (50 μ M) und TPM (60 μ M). Für den Nachweis einer potentiell veränderten Proteinexpression durch Inkubation mit den AE wurde für den Vergleich ein Kontrollansatz benötigt, der lediglich mit dem jeweiligen Lösungsmittel des AE (100 % DMSO für TPM, 50 %iges Ethanol für CBZ; Konzentration des Lösungsmittels in der Kapillarsuspension: 1:100; Lösungsmittel für PB: Inkubationslösung, deshalb ist eine Inkubation mit dem Lösungsmittel nicht notwendig) versetzt wurde.

Die Membranfraktionen der Schweinekapillaren wurden nach der Methode von Mahringer et al. (MAHRINGER u. FRICKER 2010) extrahiert. Zunächst erfolgte eine zehnminütige Zentrifugation bei 1160 g und Raumtemperatur (Mikro 200, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland). Daraufhin wurde das Pellet mit CellLytic™ und einem Protease-Inhibitor in einer Verdünnung von 25:1 resuspendiert, um die Lyse der Zellen zu initiieren. Zur Beschleunigung der Zelllyse erfolgte die Homogenisierung des Kapillargemisches mittels Mini-Homogenisator (VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland). Um *deoxyribonucleic acid* (DNA) und andere Zellorganellen zu entfernen, wurde das Kapillar-Lysat daraufhin für

30 Minuten bei 10.000 g und einer Temperatur von 4°C zentrifugiert (Sorvall RC M150 GX, Thermo Scientific, Schwerte, Deutschland). Zur Fraktionierung der Membranproteine erfolgte anschließend eine erneute Zentrifugation des Überstandes für 60 Minuten mit einer Beschleunigung von 100.000 g bei 4 °C (Sorvall RC M150 GX, ThermoScientific, Osterode, Deutschland). Das gewonnene Pellet wurde nach der Zentrifugation erneut mit CellLytic™ und dem Protease-Inhibitor Complete in einer Verdünnung von 25:1 resuspendiert und homogenisiert. Anschließend erfolgte eine Proteinbestimmung nach Lowry mittels Spectrophotometer (Genesys 10 S UV-Vis, Thermo Scientific, Schwerte, Deutschland), woraufhin die Proteinproben mit Probenpuffer (200 mM Tris, 10 % SDS, 200 mM DTT, 0,2 % Bromphenolblau, 20 % Glycerol, 25 % β -Mercaptoethanol, pH 6,8) versetzt und für fünf Minuten bei 95 °C denaturiert wurden.

Für die gelelektrophoretische Auftrennung der Proteine wurden 10-20 μ l der Proteinproben in einer Konzentration von 20 μ g/ml in die Geltaschen pipettiert und zur Ermittlung der Größe des Proteins jeweils eine Geltasche mit Marker (Protein Marker V *prestained*, peqlab, Erlangen, Deutschland) aufgefüllt. Nachdem die Elektrophoresekommer mit dem Laufpuffer [25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1 % *Sodium dodecyl sulfate* (SDS)] gefüllt wurde, erfolgte die Auftrennung der Proteine entsprechend ihrer Größe und Ladung für zunächst 20 Minuten bei 100 V und danach für 40 Minuten bei 200 V.

Anschließend wurden die Proteine für 60 Minuten bei 80 V unter Verwendung eines *Blotting*-Puffers (25 mM Tris, 96 mM Glycin) auf eine PVDF-Membran (peqlab, Erlangen Deutschland) übertragen. Die PVDF-Membran wurde vor dem Proteintransfer zur Aktivierung für fünf Minuten in Methanol gelegt.

Um unspezifische Bindungen der Antikörper zu verhindern, wurde die PVDF-Membran mit einer Blocking-Lösung versetzt (siehe Tabelle 2).

Protein	Blocking-Lösung	Blocking-Zeit	Hersteller
β-Aktin	Roti-Block	1 h	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Pgp	5 % Milchpulver in TBS/T	1 h	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
BCRP	Roti-Block	1 h	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

Tabelle 2: Verwendete Blocking-Lösungen.

Im Anschluss erfolgte die Detektion der Proteine mithilfe eines spezifischen primären Antikörpers (siehe Tabelle 2) über Nacht bei 4 °C. Die Membranen wurden daraufhin dreimal für jeweils fünf Minuten mit TBS/T (25 mM Tris, 190 mM NaCl, 0,1 % Tween 20, pH 7,7) gewaschen. β-Aktin diente als Ladekontrolle.

Primärer Antikörper	Zielstruktur	Wirt	Verdünnung	Inkubationszeit	Hersteller
Anti-β-Aktin (monoklonal)	β-Aktin	Maus	1:2500	12-24 h	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, Deutschland
BXP-53 (monoklonal)	BCRP	Ratte	1:500	12-24 h	Enzo Life Sciences GmbH, Lörrach, Deutschland
C 219 (monoklonal)	Pgp	Maus	1:100	12-24 h	Enzo Life Sciences GmbH, Lörrach, Deutschland

Tabelle 3: Verwendete Primärantikörper.

Am darauffolgenden Tag erfolgte der Nachweis des gebundenen Antikörpers durch eine einstündige Inkubation mit einem gegen das FC-Fragment des primären Antikörpers gerichteten sekundären Antikörper (siehe Tabelle 4).

Sekundärer Antikörper	Zielstruktur	Verdünnung	Inkubationszeit	Hersteller
HRP Ziege anti-Maus	Primärer Antikörper aus der Maus (Anti- β -Aktin)	1:10 000	1 h	Dianova, Hamburg, Deutschland
HRP Ziege anti-Maus	Primärer Antikörper aus der Maus (C 219)	1:1000	1 h	Dianova, Hamburg, Deutschland
HRP Esel anti-Ratte	Primärer Antikörper aus der Ratte (BXP-53)	1:10 000	1 h	Dianova, Hamburg, Deutschland

Tabelle 4: Verwendete Sekundärantikörper.

Durch Reaktion des kovalent an den sekundären Antikörper gebundenen Enzyms Meerrettich-Peroxidase (HRP) mit seinem Substrat Luminol konnte der Antikörperkomplex schließlich detektiert werden. Nachdem die Membranen erneut dreimal für fünf Minuten gewaschen wurden, erfolgte zur Abbildung der Proteine eine Inkubation mit einer *Enhanced-Chemiluminescence* (ECL)-Lösung [2 ml Tris 1M (pH 8,5), 89 μ l p-Cumarsäure, 200 μ l Luminol, 18 ml Aqua dest.] für zwei Minuten bei Raumtemperatur. HRP katalysiert die Oxidation von Luminol in ein Reagens, das bei seinem Zerfall Licht emittiert. Die Menge und Lokalisation des von HRP katalysierten Lichts korreliert direkt mit der Menge und Lokalisation des Proteins auf der Membran. Die Emission des von HRP katalysierten Lichts wurde mithilfe einer Kamera vom Typ *Chemilumineszenz Fusion Advanced FX7* Kamera (peqlab, Erlangen, Deutschland) ermittelt und mit dem Programm *Fusion Advanced Software* (peqlab, Erlangen, Deutschland) ausgewertet. Jeweils drei Membranen von drei unterschiedlichen Kapillarisolationen standen zur Auswertung ($n = 3$).

1.4. Statistik

Alle statistischen Auswertungen wurden mit der Software *Graph Pad Prism 5.0* (GraphPad Software, Inc., La Jolla, USA) durchgeführt. Die Darstellung der in der Arbeit erhobenen Daten sind als Mittelwert \pm Standardfehler (= *standard error of the mean*, SEM) der Mittelwerte angegeben. Eine statistische Signifikanz war bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit für den Fehler 1. Art von $p < 0,05$ gegeben. Für die statistische Auswertung wurde der Student's t-Test durchgeführt.

2. Proteomanalysen Blut-Hirn-Schranken-assoziiierter Proteine während der Epileptogenese

Im Rahmen vorangegangener Dissertationsarbeiten von Andreas Walker, Maruja Lucia Rettenbeck und unter Mitwirkung von Joanna Goc wurden am Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie der Tierärztlichen Fakultät der LMU in Kooperation mit der von Frau Dr. Deeg geleiteten Arbeitsgruppe des Instituts für Tierphysiologie der Tierärztlichen Fakultät der LMU und mit der von Frau Dr. Hauck geleiteten Arbeitsgruppe der *Research Unit Protein Science* des Helmholtz-Zentrums München das Proteom des HC und des PHC von Ratten während der Epileptogenese untersucht. Der Tierversuch wurde von der Regierung von Oberbayern unter dem Aktenzeichen Gz. 55.2-1-54-2532-94-11 genehmigt. Im Folgenden werden das Versuchsdesign und die Durchführung der differentiellen Proteomstudie sowie im Rahmen der Datenanalyse die Durchführung der *Pathway*-Enrichment-Analyse nur kurz erläutert. In der Dissertation von Andreas Walker werden alle genannten Aspekte umfassend beschrieben (WALKER 2016). Die Datenanalyse zur Identifizierung BHS-assoziiierter Proteine während der Epileptogenese sowie die immunhistochemische Nachweismethode im Folgenden ausführlich dargestellt.

2.1. Versuchsdesign

In einem chronischen Epilepsiemodell, dem sog. SE-BLA-Modell, wurde bei weiblichen *Sprague Dawley* Ratten ein epileptogener Insult gesetzt, um den Prozess der Epileptogenese auszulösen. Während der Epileptogenese wurden zu verschiedenen Zeitpunkten proteomische Analysen mittels einer Liquid-Chromatographie-Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS) durchgeführt. In dem SE-BLA-Modell wird durch eine elektrische Stimulation ein initialer Insult gesetzt, der nach einer Latenzzeit zur Auslösung spontaner epileptischer Anfälle führt (BRANDT et al. 2003). Dazu wurde eine Elektrode in die rechte BLA der Ratten implantiert. Nach einer Regenerationszeit von sechs Wochen wurde durch Dauerstimulation der BLA ein sich selbsterhaltender Status epilepticus induziert, der nach vier Stunden mittels Diazepam beendet wurde. Ein Teil der Ratten erhielt eine Scheinstimulation (Kontroll- oder Sham-Tiere). Im Anschluss an die Dauerstimulation wurden SE- und Sham-Tiere nach drei unterschiedlichen Zeitpunkten (zwei Tage, zehn Tage und acht Wochen) euthanasiert. Die Zeitpunkte spiegeln die frühe Post-Insult-Phase und die Latenzphase der Epileptogenese sowie den Zeitpunkt der Epilepsie-Manifestation mit spontan wiederkehrenden Anfällen (chronische Phase) wider. Die Tiergruppe in der chronischen Phase wurde ca. sechs Wochen nach SE für

19 Tage Video- und Elektroenzephalografie (EEG)-überwacht. Dies diente zur Identifizierung jener Tiere, die spontan auftretende Anfälle zeigten. Nur Tiere mit spontan wiederkehrenden Anfällen wurden für die weiteren Analysen verwendet. Zur Durchführung der differentiellen Proteomstudie wurden den Tieren nach der Euthanasie das Gewebe des HC und des PHC entnommen. Das Gehirngewebe wurde im Institut für Tierphysiologie der Ludwig-Maximilians-Universität für die Proteomanalysen aufbereitet.

Für die immunhistochemische Validierung der Proteomdaten erfolgte anschließend an die Euthanasie die Perfusion einer Subgruppe von Tieren zu den drei Zeitpunkten. Die perfusionsfixierten Gehirne wurden für *Free-Floating*-Färbungen verwendet. Das Gewebe der verbleibenden Tiere wurde in Paraffin eingebettet. Dies diente der Konservierung des Gewebes für immunhistochemische Färbungen in folgenden Studien.

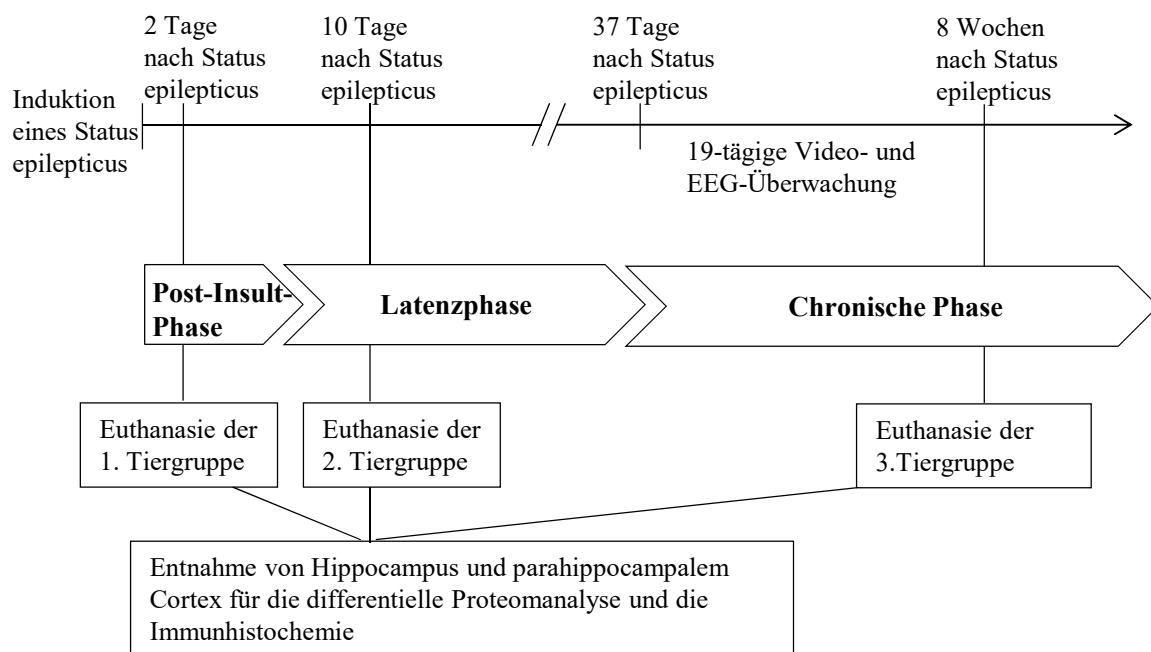


Abbildung 16: Versuchsdesign. Modifiziert nach Walker (WALKER 2016).

2.2. Durchführung der differentiellen Proteomanalyse

2.2.1. Gewebeaufbereitung und massenspektrometrische Analyse

Für die differentielle Proteomanalyse am Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie der Tierärztlichen Fakultät wurden die Ratten zwei Tage, zehn Tage und acht Wochen nach SE euthanasiert und anschließend der HC und der PHC entnommen. Die Aufbereitung des Gewebes für die massenspektrometrische Analyse erfolgte im Institut für Tierphysiologie der Tierärztlichen Fakultät. Das Gewebe wurde homogenisiert, die Proteine extrahiert und eine Proteinbestimmung mit der Bradford-Methode durchgeführt (BRADFORD 1976). Da-

raufhin wurden die Proben für die massenspektrometrische Analyse mithilfe eines FASP (filter aided sample preparation)-Verdaus aufbereitet (WISNIEWSKI et al. 2009). Im Anschluss erfolgte nach HAUCK et al. (2010) die massenspektrometrische Analyse in der Arbeitsgruppe um Stefanie Hauck am *Research Unit Protein Science* des Helmholtz-Zentrums mittels LC-MS/MS. Die durch die massenspektrometrische Analyse gewonnenen Peptide wurden im Folgenden mit der Software *Progenesis* (Version 2,5, Nonlinear Dynamics Limited, Newcastle upon Tyne, UK) markierungsfrei quantifiziert (HAUCK et al. 2010; HAUCK et al. 2012) und in der Datenbank *Ensembl* (Version 69, 32971 Sequenzen) identifiziert. Außerdem erfolgte die Berechnung des relativen Verhältnisses der durchschnittlichen Abundanzen der SE- und Kontrolltiere für jedes Protein (*fold change*) mittels Division der Mittelwerte der Abundanzen der SE-Tiere durch den Mittelwert der Abundanzen der Kontrolltiere. Als differentiell exprimiert wurden Proteine bezeichnet, die einen *fold change* $\geq 1,5$ und einen p-Wert $< 0,05$ aufwiesen sowie durch mindestens zwei Peptide quantifiziert wurden.

2.3. Datenanalysen zur Identifizierung Blut-Hirn-Schranken-assoziiierter Proteine im Verlauf der Epileptogenese

Die Identifikation der Proteine und *pathways*, die in Zusammenhang mit Veränderungen oder Modifikationen der BHS während der Epileptogenese stehen, erfolgte mithilfe einer *Pathway*-Enrichment-Analyse durch Andreas Walker sowie mittels einer Hypothesen-gestützte Recherche, einer Schlagwortsuche in den Proteinlisten und mithilfe eines Review-Artikels (HASELOFF et al. 2015). Es wird darauf hingewiesen, dass bestimmte Proteine, die nicht nur in BHS-assoziierten Prozessen, sondern auch in inflammatorischen Vorgängen der Epileptogenese involviert sind, bereits in der Dissertation von Andreas Walker aufgeführt und in einem anderen Kontext diskutiert wurden.

2.3.1. Pathway-Enrichment-Analyse

Differentielle Proteomstudien liefern eine Vielzahl differentiell modifizierter Proteine oder Abundanzen eines bestimmten Phänotyps (sog. „*high-throughput*“). Basierend auf dem derzeitigen Wissensstand über die Beziehungen zwischen Proteinen einer lebenden Zelle lassen sich durch funktionelle Analysen die experimentellen Daten interpretieren (BESSARABOVA et al. 2012).

Anhand der differentiell exprimierten Proteine wurde eine *Pathway*-Enrichment-Analyse durchgeführt, um signifikant veränderte Signalwege identifizieren zu können, die unter anderem auch auf BHS-assoziierte Veränderungen während der Epileptogenese hinweisen. Anhand dieser Signalwege konnten BHS-assoziierte Proteine identifiziert werden. Die *Pathway*-

Enrichment-Analyse erfolgte mithilfe der webbasierten Programme *Genomatix* (*Genomatix Software* GmbH, München, Deutschland) und *ConsensusPathDB* (Meta-Datenbank mit öffentlichem *Interface*). Von der *Genomatix Software Suite* wurde der Modul *Literature & Pathways* der *Genomatix Software Suite* verwendet. Sowohl *Genomatix* als auch *ConsensusPathDB* nutzen für die Analyse der *pathways* frei zugängliche *Online*-Datenbanken (z. B. *Reactome*, *NetPath*, *CellMap*, *Wikipathways*, *Ncl-nature*). *Genomatix* verfügt zusätzlich über die Möglichkeit einer literaturbezogenen *Pathway*-Suche, wobei ein proprietärer Suchalgorithmus eingesetzt wird. Für die Analyse wurden die Daten aller zu untersuchenden differentiell exprimierten Proteine in die beiden Programme geladen und vor dem Hintergrund aller in der Studie identifizierten Proteine des jeweiligen Zeitpunktes und Gewebes analysiert. Als signifikant veränderte Signalwege wurden jene mit einem $p\text{-Wert} < 0,05$ angesehen. Dabei wurden nur Signalwege betrachtet, die mindestens zwei regulierte Proteine beinhalteten.

2.3.2. Weiterführende Recherche

Um eine möglichst vollständige Liste der BHS-assoziierten Proteine zu erhalten, erfolgten zusätzlich zu der *Pathway*-Enrichment-Analyse eine Hypothesen-gestützte Recherche und eine Schlagwortsuche in den Proteinlisten. Die Recherche von relevanten Tight-Junction-Proteinen erfolgte anhand eines Review-Artikels (HASELOFF et al. 2015). Die dabei ermittelten Proteine wurden mit den Expressionsdaten der Proteine unserer Proteomstudie abgeglichen. Falls Proteine zu mindestens einem Zeitpunkt im HC oder im PHC differentiell exprimiert waren, wurden sie für weitere Analysen berücksichtigt.

In einigen Studien konnte gezeigt werden, dass das Protein *nucleolin* (NCL) eine wichtige angiogenetische Funktion besitzt (CHRISTIAN et al. 2003; HUANG et al. 2006; DESTOUCHES et al. 2008; DING et al. 2012; KOUTSIOUMPA et al. 2012; XU et al. 2012). In Hinblick auf die Epilepsieforschung ist NCL ein unerforschtes Protein. Deshalb stellt das differentiell exprimierte Protein NCL für unsere Studie ein interessantes Protein zur Erforschung BHS-assoziiierter Proteine während der Epileptogenese sowie zu Beginn der klinisch manifestierten Epilepsie dar.

Außerdem wurden zur Identifizierung weiterer ABC-Transporter-Proteine die Proteinlisten der differentiell exprimierten Proteine nach dem Suchbegriff „abc“ durchsucht.

2.3.3. Proteinexpressionsanalysen

Die graphische Darstellung der individuellen Expressionsdaten der Proteine, die durch die *Pathway*-Enrichment-Analyse und die Literaturrecherche identifiziert wurden, erfolgte mithilfe von *Heatmaps*. Durch die Anwendung von *Heatmaps* können komplexe Datensätze in Matrizen dargestellt werden. Im biologischen Kontext besteht eine solche Matrix aus Spalten, die

Daten einer einzelnen Probe enthalten, sowie Reihen, die einem spezifischen Merkmal entsprechen. Die als *Heatmaps* dargestellte Matrix wird so angeordnet, dass Spalten und Reihen mit ähnlichem Profil gruppiert (*geclustert*) werden. Im vorliegenden Projekt wurden die individuellen *fold changes* der SE- und Kontrolltiere (in Spalten angeordnet) entsprechend der ausgewählten Proteine (in Reihen angeordnet) gruppiert und graphisch dargestellt. Außerdem erfolgt eine farbliche Zuordnung jedes Datenwerts der Matrix, wodurch ein grafisches Muster entsteht (KEY 2012). Das gewählte Farbschema Rot/Blau gibt die Regulierung der Proteine an. Rot weist auf eine Herunterregulierung und Blau auf eine Heraufregulierung der Proteine hin. Außerdem wurden die tierindividuellen *fold changes* abgebildet.

Die Erstellung der *Heatmaps* erfolgte mithilfe der Programmiersprache und -umgebung *R*, die als *Open-Source-Software* frei im Internet verfügbar ist. *R* wird für graphische Darstellungen sowie statistische Berechnungen verwendet. Das *R*-Zusatzpaket „*gplots*“ (<https://cran.r-project.org/web/packages/gplots/index.html>) wurde dabei als funktionelle Erweiterung für die Erstellung der *Heatmaps* verwendet.

2.4. Immunhistochemie

Die immunhistochemische Färbung diente zur Validierung der Proteomdaten, aber auch zur Bestimmung der anatomischen und zellulären Verteilung im HC und im PHC des differentiell exprimierten Proteins NCL. Für den Nachweis von NCL stand noch kein etabliertes Färbeprotokoll zur Verfügung. Im Rahmen dieser Dissertation wurde die immunhistochemische Färbung von NCL etabliert.

2.4.1. Immunhistochemische Färbemethoden

Die Immunhistochemie ist eine auf Antigen-Antikörper-Erkennung basierende Methode zur Visualisierung spezifischer Antigene in Geweben und Zellen.

Der Nachweis der Antigene erfolgt mit spezifischen Antikörpern. Die Antikörper werden daraufhin histochemisch sichtbar gemacht. Unterschieden werden dabei eine direkte und eine indirekte Methode. Bei der direkten Immunhistochemie sind fluoreszierende Partikel (Immunofluoreszenz) oder Enzyme (alkalische Phosphatase, Meerrettich-Peroxidase) für die Farbreaktion direkt an die spezifischen Antikörper gebunden, wohingegen bei der indirekten Immunhistochemie die Erkennung der primären, an das Antigen gebundenen Antikörper durch markierte sekundäre Antikörper erfolgt. Die dabei verwendeten Antikörper werden eingeteilt in monoklonale und polyklonale Antikörper. Monoklonale Antikörper stammen aus der Zelllinie eines einzigen B-Lymphozyten und richten sich folglich gegen ein einzelnes Epitop eines Proteins. Polyklonale Antikörper hingegen werden von verschiedenen B-Lymphozyten

produziert und sind gegen viele verschiedene Epitope eines Proteins gerichtet. Der Vorteil monoklonaler Antikörper besteht in der höheren Spezifität, wohingegen eine Bindung des Antikörpers an sein spezifisches Antigen bei Maskierung oder Zerstörung des Epitops nicht mehr möglich ist.

2.4.2. Gewebeaufbereitung

Im Rahmen des Dissertationsprojekts von Andreas Walker wurde das Gehirngewebe der Ratten in Paraffin eingebettet (WALKER 2016). Das Schneiden des paraffinfixierten Gewebes erfolgte mithilfe eines Rotationsmikrotoms (1165/Rotocut, Reichert-Jung, Nußloch, Deutschland). Die Schnittdicke betrug zwei μm . Die Schnitte wurden in einem 40 °C warmen Wasserbad (Typ 24900, Medax Nagel GmbH & Co. KG, Neumünster, Deutschland) auf einen beschichteten Objektträger (Superfrost Plus, Gerhard Menzel B.V. & Co. KG, Braunschweig, Deutschland) aufgezogen und 24 Stunden bei 38 °C getrocknet.

2.4.3. Etablierung des immunhistochemischen Nachweises von *nucleolin*

Die Etablierung des immunhistochemischen Nachweises von NCL erfolgte auf der Grundlage eines modifizierten Standardprotokolls für paraffinierte Gehirnschnitte im *Cover-Plate*-Verfahren. Dafür wurde die indirekte immunhistochemische Methode angewendet. Das Standardprotokoll beschreibt die übereinstimmenden Schritte aller verwendeten Färbeprotokolle, auf das im Folgenden näher eingegangen wird. Anpassungen bzw. Veränderungen jedes Protokolls können in Tabelle 6 nachvollzogen werden.

Zunächst erfolgte die Entparaffinierung und Rehydrierung der paraffinierten Gehirnschnitte durch zweimalige Behandlung mit Xylol für drei Minuten, eine einmalige dreiminütige Behandlung in einem Gemisch aus 100%igem Ethanol und Xylol (1:1), eine zweimalige Behandlung mit 100%igem Ethanol für drei Minuten, woraufhin eine jeweils dreiminütige Behandlung in einer absteigenden Ethanol-Reihe (95 %, 70 %, 50 %) der Schnitte folgte. Anschließend wurden die Schnitte in Leitungswasser für max. fünf Minuten sowie in destilliertem Wasser gewaschen. Daraufhin erfolgte eine Demaskierung des Antigens, um die Reaktivität von formalinfixiertem, paraffiniertem Gewebe zu verbessern bzw. wieder herstellen zu können. Bei der Demaskierung werden Epitope freigelegt, die bei dem Fixierungsvorgang durch Quervernetzungen der Proteine blockiert wurden (SHI et al. 1991; SHI et al. 2011). Danach wurden die Objektträger in eine *Cover-Plate*-Apparatur (Shandon Sequenza, Thermo Electron Corporation, Dreieich, Deutschland) gespannt. Anschließend wurden die Schnitte zweimalig in 0,05 M Tris-gepufferten NaCl-Lösung (pH 7,6) gewaschen, woraufhin diese in destilliertem Wasser abgespült wurden. Zur Inaktivierung der endogenen Peroxidase erfolgte eine Behandlung mit einer Wasserstoffperoxid (H_2O_2)-Lösung. Nach dreimaligem Waschen

mit 0,05 M Tris-Pufferlösung wurden die Schnitte mit einer Blocking-Lösung inkubiert, um unspezifische Bindungen des primären Antikörpers zu verhindern. Im Anschluss daran erfolgte über Nacht die Inkubation mit dem primären Antikörper (anti-*nucleolin*) bei 4 °C (Tabelle 5). Am nächsten Tag wurden die Schnitte nach dreimaligem Waschen mit der Tris-Pufferlösung mit dem biotinylierten sekundären Antikörper in der verwendeten Blocking-Lösung (biotinylierte Ziege anti-Kaninchen 1:500; Tabelle 5) inkubiert und anschließend zur Entfernung der noch ungebundenen Antikörper erneut dreimal mit der Tris-Pufferlösung gewaschen. Im Anschluss erfolgte eine 30-minütige Behandlung mit einem Streptavidin-HRP-Komplex (Streptavidin/HRP 1:1400, 0,05 M TBS), woraufhin das überschüssige Streptavidin/HRP durch dreimalige Spülung mit der Tris-Pufferlösung entfernt wurde. Nachdem die Schnitte mit destilliertem Wasser gespült wurden, erfolgte zur Visualisierung der Antikörperkonjugate eine Behandlung mit einer DAB-Reaktionslösung und erneuter Spülung mit destilliertem Wasser. Anschließend wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Ethanolreihe sowie in Xylol für jeweils fünf Minuten dehydriert. Hierfür erfolgte eine einmalige Behandlung mit 70%igem und 96%igem Ethanol, woraufhin eine jeweils zweimalige Behandlung mit 100%igem Ethanol sowie Xylol folgte. Daraufhin wurden die Schnitte mit Entellan eingedeckt.

Anschließend an die immunhistochemische Färbung wurden mit der Bildanalysesoftware KS 400 (Carl Zeiss, Microimaging GmbH, Göttingen, Deutschland) Bilder vom HC und vom PHC an einem Lichtmikroskop (Olympus BH-2, Japan), das an eine Kamera (Zeiss AxioCam MRc, Carl Zeiss, Jena, Deutschland) angeschlossen war, angefertigt.

Antikörper	Zielstruktur	Inkubationszeit	Hersteller
Primärer Antikörper:	<i>nucleolin</i>	12-24 h	Santa Cruz, USA
1. C23 (MS-3)			
2. EPR7952 (monoklonal)			
Sekundärer Antikörper: Ziege anti-Kaninchen biotinyliert	Primärer Antikörper aus dem Kaninchen	30 min	Dianova, Hamburg, Deutschland

Tabelle 5: Verwendete Primär- und Sekundärantikörper.

Demaskierung	Peroxidase-behandlung	Blocking-Lösung	Primärer AK	Konzentration	DAB
20 min bei 720 W in der Mikrowelle in 10 mM NaCitrat pH 6 kochen	3 % H ₂ O ₂ in 0,05 M TBS für 10 min	Serum-freier Casein-Block (0,25 % Casein, 0,05 M TBS)	Anti-NCL (polyklonal) C23 (MS-3; Santa Cruz USA) in serumfreiem Casein-Block mit 0,1 % Tween 20	1:50 1:250 1:500	30 min in Diaminobenzidin-Reaktionslösung (DAB, Tris-NaCl, 30 % H ₂ O ₂)/ 30 s in Hämalun
20 min bei 720 W in der Mikrowelle in 10 mM NaCitrat pH 6 kochen	3 % H ₂ O ₂ in 0,05 M TBS für 15 min	Serum-freier Casein-Block (0,25 % Casein, 0,05 M TBS)	Anti-NCL (polyklonal) C23 (MS-3; Santa Cruz USA) in serumfreiem Casein-Block mit 0,1 % Tween 20	1:50	30 min in Diaminobenzidin-Reaktionslösung (DAB, Tris-NaCl, 30 % H ₂ O ₂)/ 5 min in Hämalun
20 min bei 720 W in der Mikrowelle in 10 mM NaCitrat pH 6 kochen	3 % H ₂ O ₂ in 0,05 M TBS für 15 min	Serum-freier Casein-Block (0,25 % Casein, 0,05 M TBS)	Anti-NCL (polyklonal) C23 (MS-3; Santa Cruz USA) in serumfreiem Casein-Block mit 0,1 % Tween 20	1:50	30 min in Diaminobenzidin-Reaktionslösung (DAB, Tris-NaCl, 30 % H ₂ O ₂)/ 5 min Hämalun
20 min bei 720 W in der Mikrowelle in 10 mM NaCitrat pH 6 kochen	3 % H ₂ O ₂ in 0,05 M TBS für 15 min	Serum-freier Casein-Block (0,25 % Casein, 0,05 M TBS)	Anti-NCL (polyklonal) C23 (MS-3; Santa Cruz USA) in serumfreiem Casein-Block mit 0,1 % Tween 20	1:50	30 min in Diaminobenzidin-Reaktionslösung (DAB, Tris-NaCl, 30 % H ₂ O ₂)/ 1 min Hämalun
20 min bei 720 W in der Mikrowelle in 10 mM NaCitrat pH 6 kochen	3 % H ₂ O ₂ in 0,05 M TBS für 15 min	Serum-Block [9,5 ml Carrier (Ziege), 0,5 ml Ziegenserum, 200 mg BSA]	Anti-NCL (polyklonal) C23 (MS-3, Santa Cruz USA) in serumfreiem Casein-Block mit 0,1 % Tween 20	1:50	30 min in Diaminobenzidin-Reaktionslösung (DAB, Tris-NaCl, 30 % H ₂ O ₂)/ 1 min Hämalun
Tris-EDTA-Puffer (10 mM Tris, 1mM EDTA, 0,05 % Tween 20, pH 9) in der Mikrowelle bei 720 Watt für 20 min kochen	3 % H ₂ O ₂ in 0,05 M TBS für 15 min	Serum-Block [9,5 ml Carrier (Ziege), 0,5 ml Ziegenserum, 200 mg BSA] und Serum-freier Casein-Block (0,25 % Casein, 0,05 M TBS)	Anti-NCL (polyklonal) C23 (MS-3; Santa Cruz USA) in serumfreiem Casein-Block mit 0,1 % Tween 20	1:50	30 min in Diaminobenzidin-Reaktionslösung (DAB, Tris-NaCl, 30 % H ₂ O ₂)/ 1 min Hämalun
10 min in Eisessig/Ethanol 1+2 bei -20°C	3 % H ₂ O ₂ in 0,05 M TBS für 15 min	Serum-Block [9,5 ml Carrier (Ziege), 0,5 ml Ziegenserum, 200 mg BSA] und Serum-freier Casein-Block (0,25 % Casein, 0,05 M TBS)	Anti-NCL (polyklonal) C23 (MS-3; Santa Cruz USA) in serumfreiem Casein-Block mit 0,1 % Tween 20	1:50	30 min in Diaminobenzidin-Reaktionslösung (DAB, Tris-NaCl, 30 % H ₂ O ₂)/ 1 min Hämalun
15 min in Trypsinlösung (8 g NaCl; 0,2 g KCl; 0,2 g KH ₂ PO ₄ ; 1,15 g Na ₂ HPO ₄ ; 1,25 g EDTA; 1,25 g Trypsin; Aqua dest. ad 1 l; pH 7,4 bei 37°C)	3 % H ₂ O ₂ in 0,05 M TBS für 15 min	Serum-Block [9,5 ml Carrier (Ziege), 0,5 ml Ziegenserum, 200 mg BSA] und Serum-freier Casein-Block (0,25 % Casein, 0,05 M TBS)	Anti-NCL (polyklonal) C23 (MS-3; Santa Cruz USA) in serumfreiem Casein-Block mit 0,1 % Tween 20	1:50 1:50	30 min in Diaminobenzidin-Reaktionslösung (DAB, Tris-NaCl, 30 % H ₂ O ₂)/ 1 min Hämalun
20 min bei 720 W in der Mikrowelle in 10 mM NaCitrat pH 6 kochen	3 % H ₂ O ₂ in 0,05 M TBS für 15 min	Serum-freier Casein-Block (0,25 % Casein, 0,05 M TBS)	Anti-NCL (polyklonal) C23 (MS-3; Santa Cruz USA) in serumfreiem Casein-Block mit 0,1 % Tween 20	1:50	30 min in Diaminobenzidin-Reaktionslösung (DAB, Tris-NaCl, 30 % H ₂ O ₂)/ 1 min Hämalun

20 min bei 720 W in der Mikrowelle in 10 mM NaCitrat pH 6 kochen	3 % H ₂ O ₂ in 0,05 M TBS für 15 min	Serum-freier Casein-Block (0,25 % Casein, 0,05 M TBS)	Anti-NCL (monoklonal) in serumfreiem Casein-Block mit 0,1 % Tween 20: EPR7952; Abcam (UK)	1:100 1:250 1:500	15 min in Diaminobenzidin-Reaktionslösung (DAB, Tris-NaCl, 30 % H ₂ O ₂)/ 1 min Hämalalaun
20 min bei 720 W in der Mikrowelle in 10 mM NaCitrat pH 6 kochen	3 % H ₂ O ₂ in 0,05 M TBS für 15 min	Serum-freier Casein-Block (0,25 % Casein, 0,05 M TBS)	Anti-NCL (monoklonal) in serumfreiem Casein-Block mit 0,1 % Tween 20: EPR7952; Abcam (UK)	1:500 1:1000 1:2000	9 min in Diaminobenzidin-Reaktionslösung mit Nickel (DAB, Tris-Nickel, 30 % H ₂ O ₂)
20 min bei 720 W in der Mikrowelle in 10 mM NaCitrat pH 6 kochen	3 % H ₂ O ₂ in 0,05 M TBS für 15 min	Serum-freier Casein-Block (0,25 % Casein, 0,05 M TBS)	Anti-NCL (monoklonal) in serumfreiem Casein-Block mit 0,1 % Tween 20: EPR7952; Abcam (UK)	1:2000 1:5000	9 min in Diaminobenzidin-Reaktionslösung mit Nickel (DAB, Tris-Nickel, 30 % H ₂ O ₂)
20 min bei 720 W in der Mikrowelle in 10 mM NaCitrat pH 6 kochen	3 % H₂O₂ in 0,05 M TBS für 15 min	Serum-freier Casein-Block (0,25 % Casein, 0,05 M TBS)	Anti-NCL (monoklonal) in serumfreiem Casein-Block mit 0,1 % Tween 20: EPR7952; Abcam (UK)	1:2000	9 min in Diaminobenzidin-Reaktionslösung mit Nickel (DAB, Tris-Nickel, 30 % H₂O₂)

Tabelle 6: Färbeprotokolle: Etablierung des immunhistochemischen Nachweises von *nucleolin*. Es sind die Schritte des Färbeprotokolls aufgeführt, die sich voneinander unterscheiden. Die Entparaffinierung, die Streptavidin/HRP-Behandlung, die Inkubationszeit des primären Antikörpers, der verwendete sekundäre Antikörper sowie dessen Konzentration und Inkubationszeit, die Rehydrierung und alle Wachschrte wurden nicht verändert und sind dem Text zu entnehmen. Das Färbeprotokoll mit dem besten Resultat ist in der Tabelle hervorgehoben.

V. ERGEBNISSE

1. Effekte der Antiepileptika auf die Transporter-Funktion und die - Expression im zeitlichen Verlauf

1.1. Auswirkungen auf die Transportaktivität

Die Transportaktivität von Pgp, BCRP und MRP2 wurde nach ein-, drei-, und fünfstündiger Inkubation isolierter porciner Gehirnapillaren mit PB (170 μ M), CBZ (50 μ M) und TPM (60 μ M) in therapeutisch relevanten Konzentrationen mittels Transport-Assay ermittelt (n = 3). Nach Zugabe der spezifischen fluoreszierenden Substrate [NBD-CSA (2 μ M) für Pgp, BODIPY-Prazosin (1,5 μ M) für BCRP und Texas Red (2 μ M) für MRP2] wurden Bilder am konfokalen Mikroskop angefertigt. Anhand dieser Bilder erfolgte die Messung der luminalen Substratakkumulation durch die Software *Image J*. Die durch die AE bedingten Effekte wurden im Vergleich zum Kontrollansatz erhoben. Die spezifische luminale Substratkonzentration wurde durch Zugabe der spezifischen Modulatoren [PSC-833 (5 μ M) für Pgp, FTC (5 μ M) für BCRP und MK-571 (20 μ M) für MRP2] in einem weiteren Ansatz ermittelt. Dadurch konnte auf die spezifische Transportaktivität der ABC-Transporter Pgp, BCRP und MRP2 geschlossen werden.

1.1.1. P-Glykoprotein

Phenobarbital

In Abbildung 17 sind beispielhaft frisch isolierte porcine Gehirnkapillaren mit luminaler NBD-CSA-Akkumulation unter Kontrollbedingungen (A) und nach dreistündiger Exposition mit 170 μM PB dargestellt (B). Eine einstündige Inkubation isolierter porciner Gehirnkapillaren mit PB zeigte keine signifikanten Veränderungen der spezifischen luminalen NBD-CSA-Akkumulation. Die Exposition mit PB führte nach drei und fünf Stunden zu einer signifikant erhöhten spezifischen luminalen NBD-CSA-Akkumulation um 28 % bzw. 14 % (Abbildung 18).

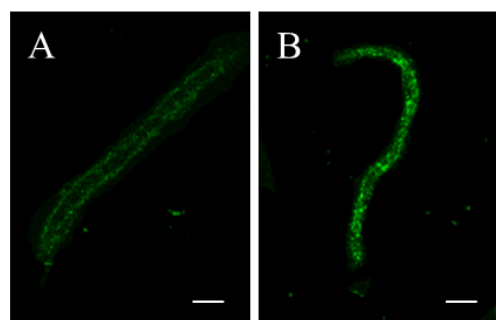


Abbildung 17: Luminale Substratakkumulation von 2 μM NBD-CSA in isolierten porcinen Gehirnkapillaren unter Kontrollbedingungen (A) und nach Exposition mit 170 μM Phenobarbital (B). Maßstab = 10 μm .

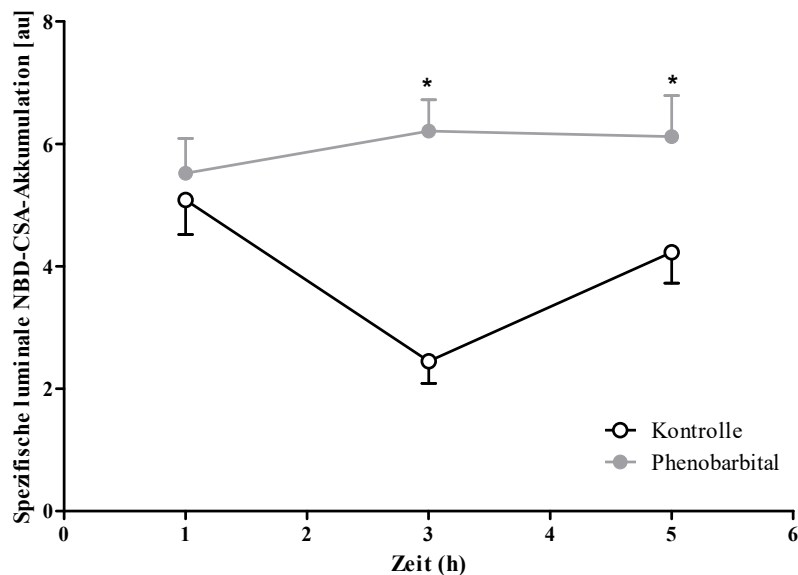


Abbildung 18 Zeitverlauf der spezifischen luminalen NBD-CSA-Akkumulation in porcinen Gehirnkapillaren nach Inkubation mit 170 μM Phenobarbital und 5 μM PSC-833 ($n = 3$). Die Exposition mit Phenobarbital führte nach einer Stunde zu keiner signifikanten Veränderung der spezifischen luminalen NBD-CSA-Akkumulation. Nach drei- und fünfstündiger Inkubation mit Phenobarbital konnte eine signifikant erhöhte spezifische luminalen NBD-CSA-Akkumulation gemessen werden. * = im Vergleich zur Kontrolle signifikant, $p < 0,05$; Mittelwerte \pm SEM.

Carbamazepin

Abbildung 19 zeigt beispielhaft die luminal NBD-CSA ($2\ \mu\text{M}$)-Akkumulation in isolierten porcinen Gehirnkapillaren unter Kontrollbedingungen (A) und nach dreistündiger Exposition mit $50\ \mu\text{M}$ CBZ (B). Eine Exposition isolierter porciner Gehirnkapillaren mit CBZ für eine Stunde zeigte keine signifikante Veränderung der spezifischen luminalen Substratakkumulation. Die Inkubation der Gehirnkapillaren mit CBZ führte nach drei und fünf Stunden zu einer signifikant erhöhten spezifischen luminalen Substratakkumulation um 19 % bzw. 11 % (Abbildung 20).

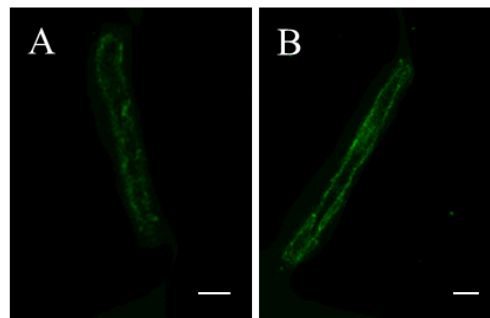


Abbildung 19: Luminal Substratakkumulation von $2\ \mu\text{M}$ NBD-CSA in isolierten porcinen Gehirnkapillaren unter Kontrollbedingungen (A) und nach dreistündiger Inkubation mit $50\ \mu\text{M}$ Carbamazepin (B). Maßstab = $10\ \mu\text{m}$.

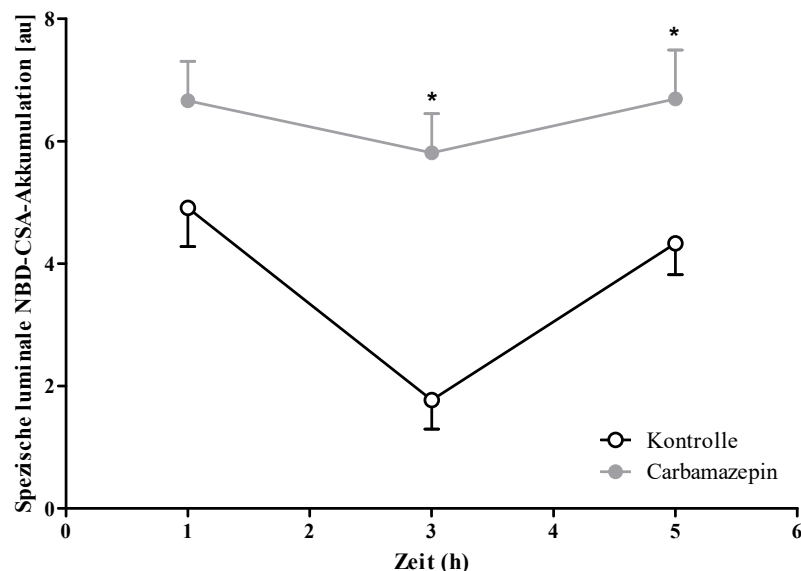


Abbildung 20: Zeitverlauf der spezifischen luminalen NBD-CSA-Akkumulation in porcinen Gehirnkapillaren nach Inkubation mit $50\ \mu\text{M}$ Carbamazepin und mit $5\ \mu\text{M}$ PSC-833 ($n = 3$). Die Exposition mit Carbamazepin führte nach einer Stunde zu keiner signifikanten Veränderung der spezifischen luminalen NBD-CSA-Akkumulation. Nach einer drei- und fünfstündigen Inkubation konnte eine signifikant erhöhte spezifische luminal Substratakkumulation von NBD-CSA nachgewiesen werden. * = im Vergleich zur Kontrolle signifikant, $p < 0,05$; Mittelwerte \pm SEM.

Topiramat

In Abbildung 21 sind beispielhaft frisch isolierte porcine Gehirnkapillaren mit luminaler NBD-CSA ($2\ \mu\text{M}$)-Akkumulation unter Kontrollbedingungen (A) sowie nach dreistündiger Exposition mit $60\ \mu\text{M}$ TPM dargestellt (B). Die Auswertung ergab, dass eine Inkubation isolierter porciner Gehirnkapillaren bereits nach einer Stunde eine signifikante Reduktion der spezifischen luminalen Substratakkumulation um 16 % erfolgte. Die Exposition mit TPM führte nach drei und fünf Stunden zu keiner signifikanten Veränderung der spezifischen luminalen Substratakkumulation (Abbildung 22).

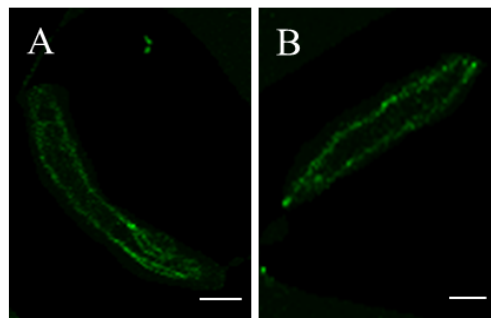


Abbildung 21: Luminale Substratakkumulation von $2\ \mu\text{M}$ NBD-CSA in isolierten porcinen Gehirnkapillaren unter Kontrollbedingungen (A) und nach dreistündiger Inkubation mit $60\ \mu\text{M}$ Topiramat (B). Maßstab = $10\ \mu\text{m}$.

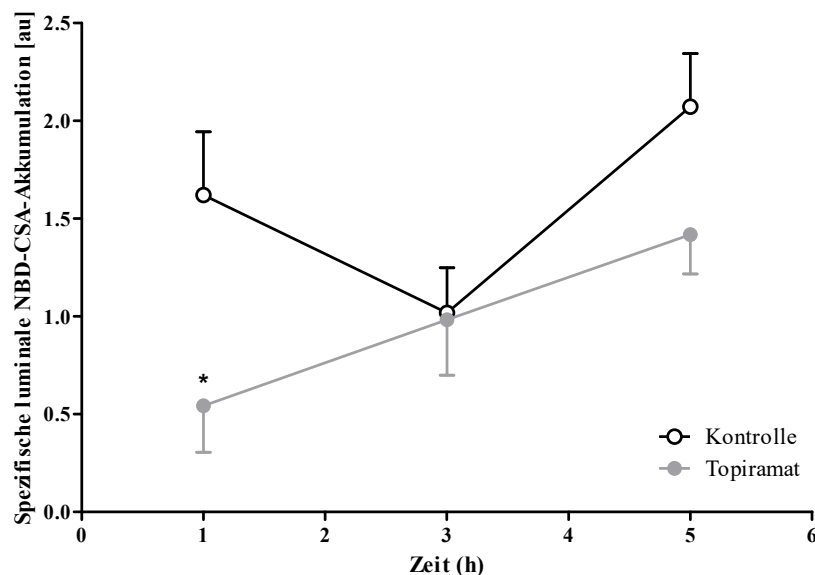


Abbildung 22: Zeitverlauf der spezifischen luminalen NBD-CSA-Akkumulation in porcinen Gehirnkapillaren nach Inkubation mit $60\ \mu\text{M}$ Topiramat und mit $5\ \mu\text{M}$ PSC-833 ($n = 3$). Nach einer einstündigen Inkubation von Topiramat konnte eine signifikante Erniedrigung der spezifischen luminalen NBD-CSA-Akkumulation festgestellt werden. Eine Exposition mit Topiramat für drei und fünf Stunden hatte keinen Einfluss auf die spezifische luminalen Substratakkumulation. * = im Vergleich zur Kontrolle signifikant, $p < 0,05$; Mittelwerte \pm SEM.

1.1.2. *Breast cancer resistance protein*

Phenobarbital

Die luminale BODIPY-Prazosin-Akkumulation ($1,5 \mu\text{M}$) in porcinen Gehirnkapillaren nach dreistündiger Exposition mit $170 \mu\text{M}$ PB im Vergleich zur Kontrolle zeigt die Abbildung 23. Die Exposition isolierter porciner Gehirnkapillaren mit $170 \mu\text{M}$ PB führte weder nach einer Stunde noch nach drei Stunden zu einer signifikanten Veränderungen der spezifischen luminalen BODIPY-Prazosin-Akkumulation. Nach fünf Stunden zeigte sich eine signifikante Reduktion der spezifischen luminalen Substratakkumulation um 16 % (Abbildung 24).

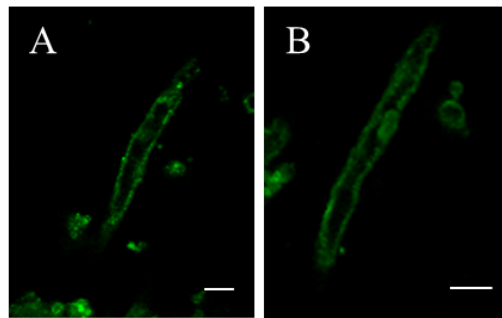


Abbildung 23: Luminale Substratakkumulation von $1,5 \mu\text{M}$ BODIPY-Prazosin in isolierten porcinen Gehirnkapillaren unter Kontrollbedingungen (A) und nach dreistündiger Inkubation mit $170 \mu\text{M}$ Phenobarbital (B). Maßstab = $10 \mu\text{m}$.

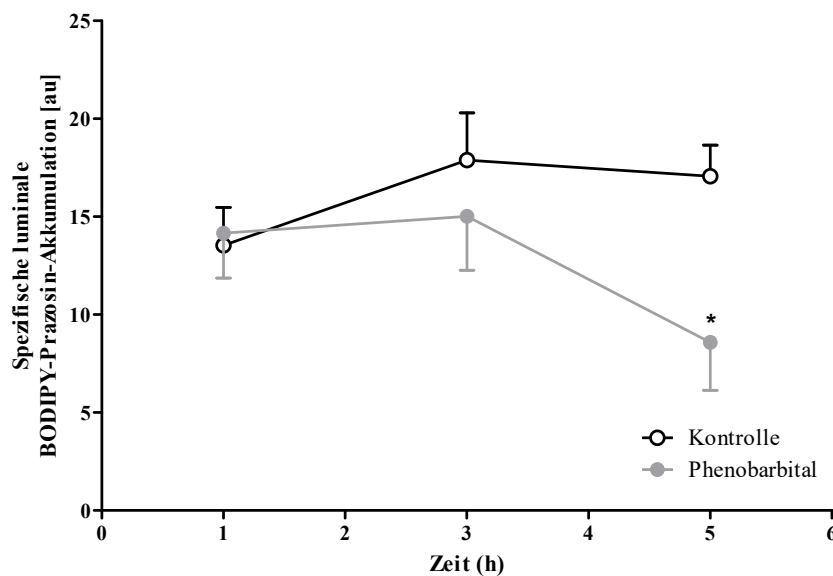


Abbildung 24: Zeitverlauf der spezifischen luminalen BODIPY-Prazosin-Akkumulation in porcinen Gehirnkapillaren nach Inkubation mit $170 \mu\text{M}$ Phenobarbital und mit $5 \mu\text{M}$ FTC ($n = 3$). Eine ein- und dreistündige Exposition mit Phenobarbital führte zu keiner signifikanten Veränderung der spezifischen luminalen Substratakkumulation, wohingegen es nach fünf Stunden zu einer signifikant erniedrigten spezifischen luminalen Substratakkumulation kam. * = im Vergleich zur Kontrolle signifikant, $p < 0,05$; Mittelwerte \pm SEM.

Carbamazepin

Abbildung 25 zeigt die BODIPY-Prazosin-Akkumulation ($1,5 \mu\text{M}$) im Lumen porciner Gehirnkapillaren unter Kontrollbedingungen sowie nach dreistündiger Inkubation mit $50 \mu\text{M}$ CBZ. Die Inkubation isolierter porciner Gehirnkapillaren mit $50 \mu\text{M}$ CBZ führte zu keinem Zeitpunkt der Messung zu einer signifikanten Veränderung der spezifischen luminalen BODIPY-Prazosin-Akkumulation (Abbildung 26).

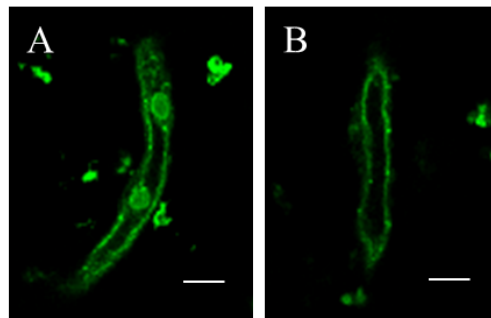


Abbildung 25: Luminale Substratakkumulation von $1,5 \mu\text{M}$ BODIPY-Prazosin in frisch isolierten porcinen Gehirnkapillaren unter Kontrollbedingungen (A) und nach dreistündiger Inkubation mit $50 \mu\text{M}$ Carbamazepin (B). Maßstab = $10 \mu\text{m}$.

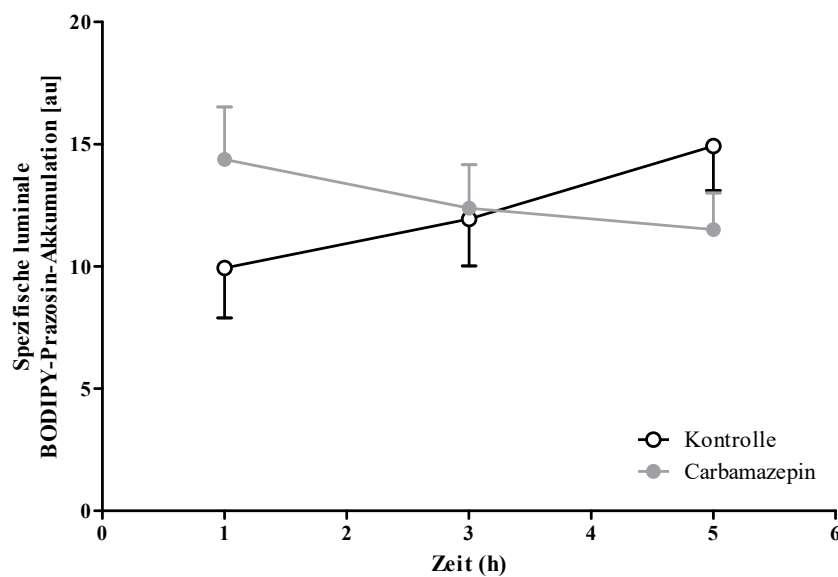


Abbildung 26: Zeitverlauf der spezifischen luminalen BODIPY-Prazosin -Akkumulation in porcinen Gehirnkapillaren nach Inkubation mit $50 \mu\text{M}$ Carbamazepin und mit $5 \mu\text{M}$ FTC ($n = 3$). Es konnte zu keinem Zeitpunkt eine signifikante Veränderung der spezifischen Substratakkumulation im Lumen der Kapillaren nach einer Inkubation mit Carbamazepin festgestellt werden. * = im Vergleich zur Kontrolle signifikant, $p < 0,05$; Mittelwerte \pm SEM.

Topiramat

Die luminaire Substratakkumulation von 1,5 μM BODIPY-Prazosin in porcinen Gehirnkapillaren ist nach dreistündiger Exposition mit 60 μM TPM im Vergleich zur Kontrolle in Abbildung 27 dargestellt. Eine einstündige Inkubation isolierter Gehirnkapillaren von Schweinen mit TPM hatte keinen Einfluss auf die spezifische luminaire Substratanreicherung. Nach Exposition mit 60 μM TPM konnte nach drei und fünf Stunden eine signifikant erniedrigte spezifische luminaire Substratakkumulation von BODIPY-Prazosin um 17 % bzw. 22 % gemessen werden. (Abbildung 28).

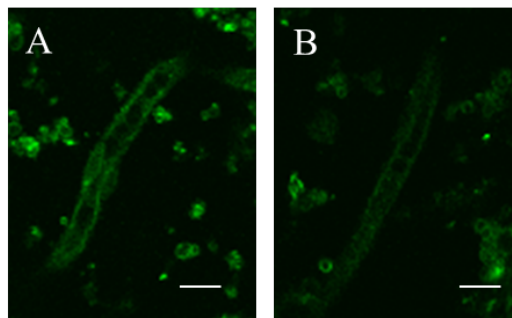


Abbildung 27: Luminaire Substratakkumulation von 1,5 μM BODIPY-Prazosin in isolierten porcinen Gehirnkapillaren unter Kontrollbedingungen (A) und nach dreistündiger Inkubation mit 60 μM Topiramat (B). Maßstab = 10 μm .

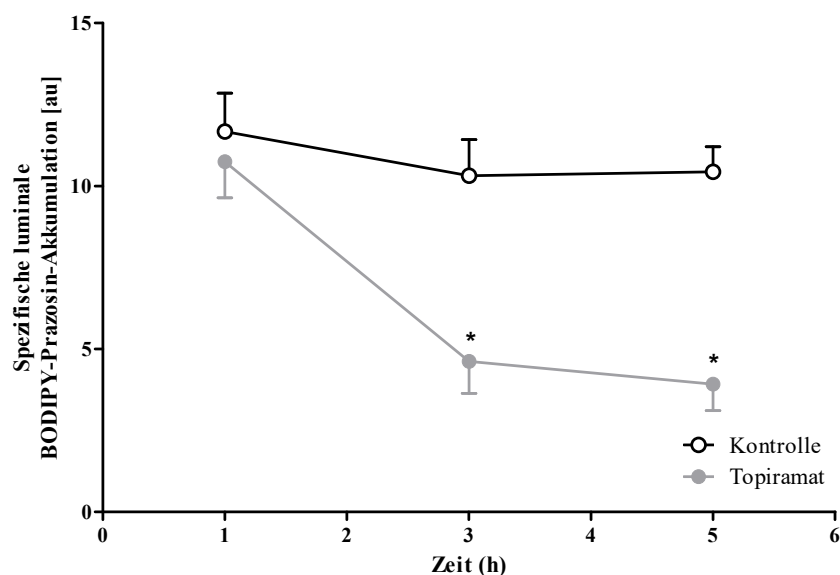


Abbildung 28: Zeitverlauf der spezifischen luminalen BODIPY-Prazosin-Akkumulation in porcinen Gehirnkapillaren nach Inkubation mit 60 μM Topiramat und mit 5 μM FTC ($n = 3$). Eine einstündige Inkubation mit Topiramat führte zu keiner signifikanten Veränderung der spezifischen BODIPY-Prazosin-Akkumulation im Lumen der Kapillaren. Allerdings konnte nach drei und fünf Stunden eine signifikante Erniedrigung der spezifischen luminalen Substratakkumulation festgestellt werden. * = im Vergleich zur Kontrolle signifikant, $p < 0,05$; Mittelwerte \pm SEM.

1.1.3. *Multidrug resistance-associated protein 2*

Phenobarbital

In Abbildung 29 ist die Texas Red-Akkumulation ($2\ \mu\text{M}$) in isolierten porcinen Gehirnkapillaren unter Kontrollbedingungen (A) und nach dreistündiger Exposition mit $170\ \mu\text{M}$ PB abgebildet (B). Eine Inkubation isolierter Gehirnkapillaren mit $170\ \mu\text{M}$ PB führte zu allen drei Zeitpunkten zu einer signifikanten Erhöhung der spezifischen luminalen Texas Red-Akkumulation in porcinen Gehirnkapillaren (nach einer Stunde um 46 %, nach drei Stunden um 30 %, nach fünf Stunden um 27 %; Abbildung 30).

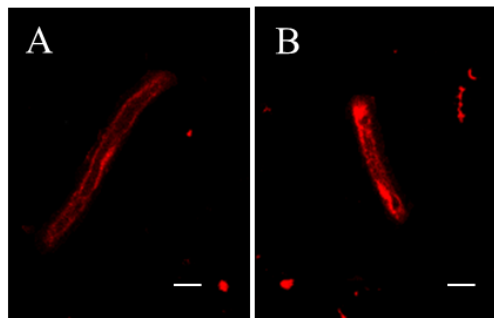


Abbildung 29: Luminale Substratakkumulation von $2\ \mu\text{M}$ Texas Red in isolierten porcinen Gehirnkapillaren unter Kontrollbedingungen (A) und nach dreistündiger Inkubation mit $170\ \mu\text{M}$ Phenobarbital (B). Maßstab = $10\ \mu\text{m}$.

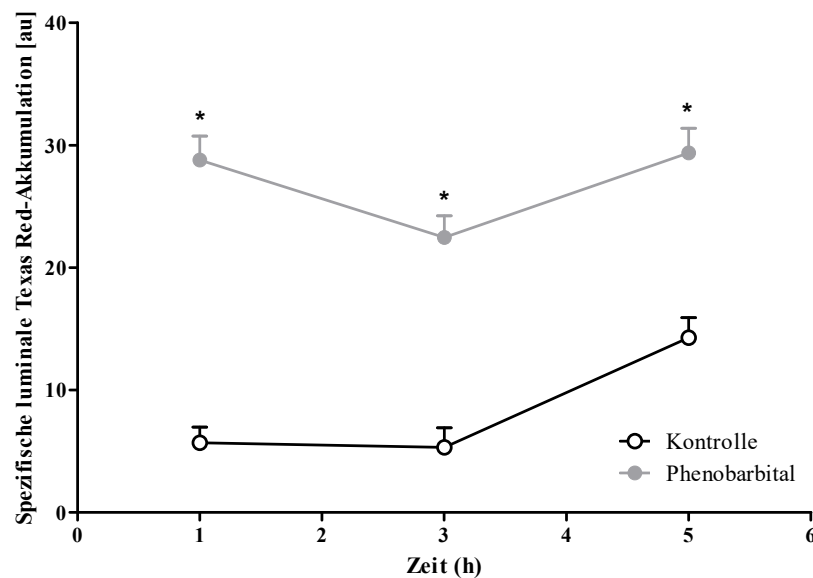


Abbildung 30: Zeitverlauf der spezifischen luminalen Texas Red-Akkumulation in porcinen Gehirnkapillaren nach Inkubation mit $170\ \mu\text{M}$ Phenobarbital und mit $20\ \mu\text{M}$ MK-571 ($n = 3$). Es konnte zu allen drei Zeitpunkten eine signifikante Erhöhung der spezifischen luminalen Substratakkumulation nach Exposition mit Phenobarbital festgestellt werden. * = im Vergleich zur Kontrolle signifikant, $p < 0,05$; Mittelwerte \pm SEM.

Carbamazepin

In Abbildung 31 ist die Texas Red-Akkumulation ($2\ \mu\text{M}$) in isolierten porcinen Gehirnkapillaren unter Kontrollbedingungen (A) und nach dreistündiger Exposition mit $50\ \mu\text{M}$ CBZ abgebildet (B). Nach Exposition isolierter Gehirnkapillaren von Schweinen mit $50\ \mu\text{M}$ CBZ konnte nach einer Stunde, nach drei und nach fünf Stunden eine signifikante Erhöhung der spezifischen Texas Red-Akkumulation im Kapillarlumen um 14 %, 9 %, bzw. 23 % festgestellt werden (Abbildung 32).

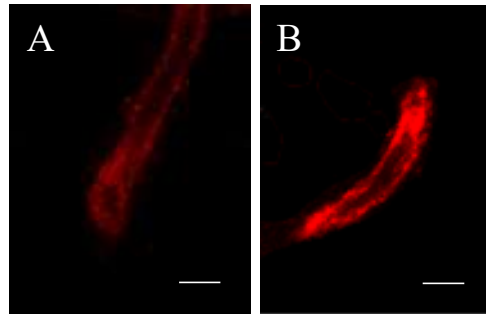


Abbildung 31: Luminale Substratakkumulation von $2\ \mu\text{M}$ Texas Red in isolierten porcinen Gehirnkapillaren unter Kontrollbedingungen (A) und nach dreistündiger Inkubation mit $50\ \mu\text{M}$ Carbamazepin (B). Maßstab = $10\ \mu\text{m}$.

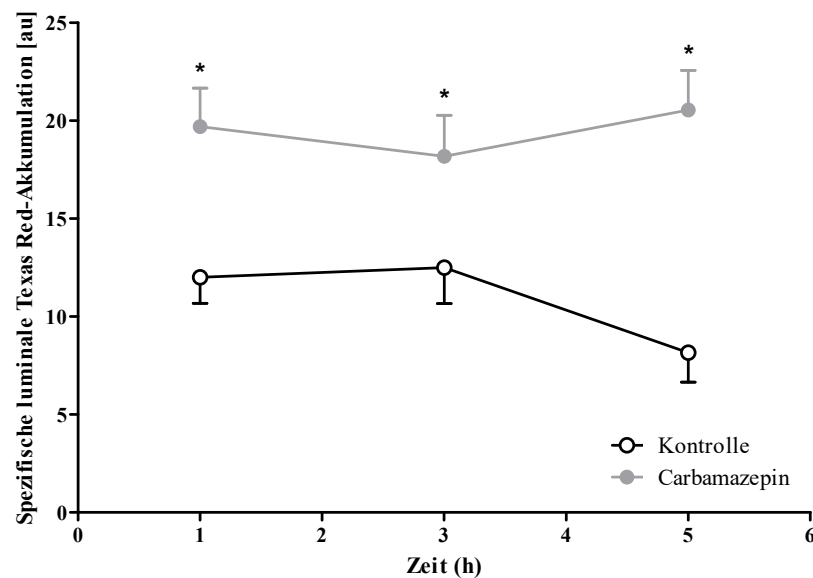


Abbildung 32: Zeitverlauf der spezifischen luminalen Texas Red-Akkumulation in porcinen Gehirnkapillaren nach Inkubation mit $50\ \mu\text{M}$ Carbamazepin und mit $20\ \mu\text{M}$ MK-571 ($n = 3$). Eine Exposition der Gehirnkapillaren mit Carbamazepin führte zu einer signifikanten Erhöhung der spezifischen luminalen Substratakkumulation zu allen drei Zeitpunkten der Messung. * = im Vergleich zur Kontrolle signifikant, $p < 0,05$; Mittelwerte \pm SEM.

Topiramat

Die luminal Substratakkumulation von Texas Red ($2\ \mu\text{M}$) in porcinen Gehirnkapillaren nach dreistündiger Exposition mit $60\ \mu\text{M}$ TPM im Vergleich zur Kontrolle ist in Abbildung 33 dargestellt. Eine Inkubation isolierter porciner Gehirnkapillaren mit $60\ \mu\text{M}$ TPM führte nach einer Stunde zu einer signifikanten Erhöhung der spezifischen luminalen Texas Red-Akkumulation in porcinen Gehirnkapillaren um 10 %. Nach einer drei- und fünfstündigen Exposition konnte eine signifikante Reduktion um 12 % bzw. 13 % festgestellt werden (Abbildung 34).

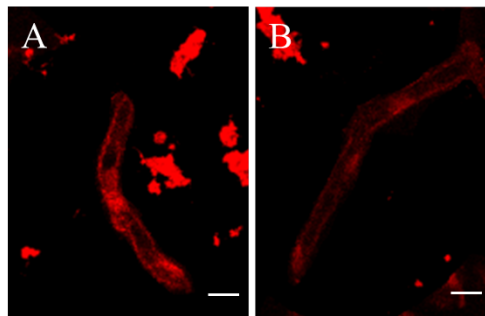


Abbildung 33: Luminal Substratakkumulation von $2\ \mu\text{M}$ Texas Red in isolierten porcinen Gehirnkapillaren unter Kontrollbedingungen (A) und nach Exposition der Gehirnkapillaren mit $60\ \mu\text{M}$ Topiramat (B) nach drei Stunden. Maßstab = $10\ \mu\text{m}$.

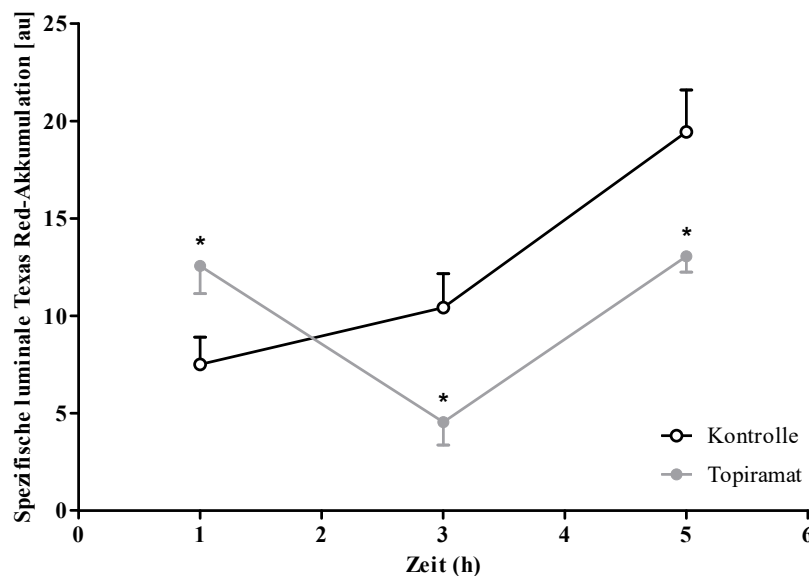


Abbildung 34: Zeitverlauf der spezifischen luminalen Texas Red-Akkumulation in porcinen Gehirnkapillaren nach Inkubation mit $60\ \mu\text{M}$ Topiramat und mit $20\ \mu\text{M}$ MK-571 ($n = 3$). Eine Inkubation mit Topiramat führte nach einer Stunde zu einer signifikanten Erhöhung, nach drei und fünf Stunden zu einer signifikanten Reduktion der spezifischen luminalen Substratakkumulation in porcinen Gehirnkapillaren. * = im Vergleich zur Kontrolle signifikant, $p < 0,05$; Mittelwerte \pm SEM.

1.2. Auswirkungen auf die Proteinexpression

Der Nachweis der Proteinexpression von Pgp, BCRP und MRP2 nach dreistündiger Inkubation isolierter porciner Gehirnkapillaren mit PB (170 μ M), CBZ (50 μ M) und TPM (60 μ M) erfolgte mittels Western Blot.

1.2.1. P-Glykoprotein

Eine dreistündige Exposition isolierter porciner Gehirnkapillaren mit PB und TPM führte zu keiner signifikanten Veränderung der Proteinexpression von Pgp. Nach einer Inkubation mit CBZ konnte eine signifikante Erniedrigung der Proteinexpression von Pgp festgestellt werden (Abbildung 35).

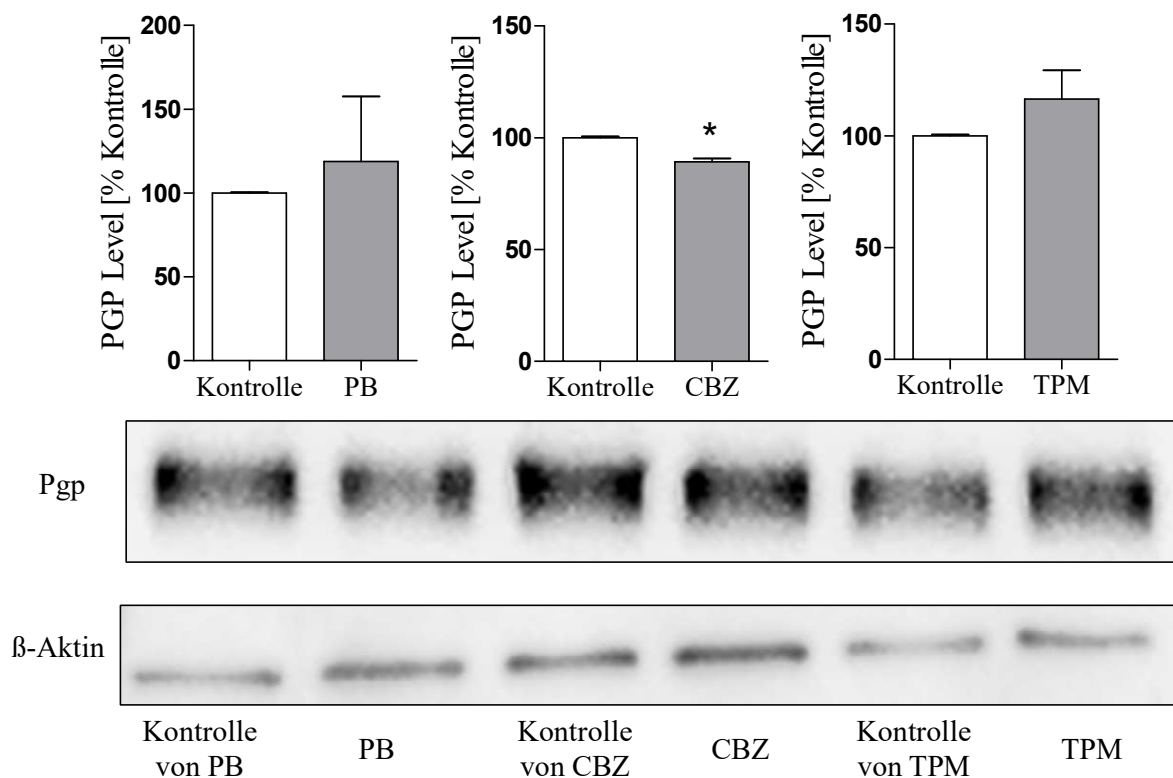


Abbildung 35: Proteinexpression des Transporters Pgp und der Ladekontrolle β -Aktin in porcinen Gehirnkapillaren ($n = 3$). Eine dreistündige Exposition mit 170 μ M Phenobarbital (PB) und 60 μ M Topiramat (TPM) führte zu keiner signifikanten Veränderung der Pgp-Proteinexpression. Nach einer dreistündigen Inkubation mit 50 μ M Carbamazepin (CBZ) konnte eine signifikante Erniedrigung der Pgp-Proteinexpression festgestellt werden. * = im Vergleich zur Kontrolle signifikant, $p < 0,05$.

1.2.2. *Breast cancer resistance protein*

Eine dreistündige Exposition isolierter porciner Gehirnkapillaren mit PB, CBZ und TPM führte zu keiner signifikanten Veränderung der BCRP-Proteinexpression (Abbildung 36).

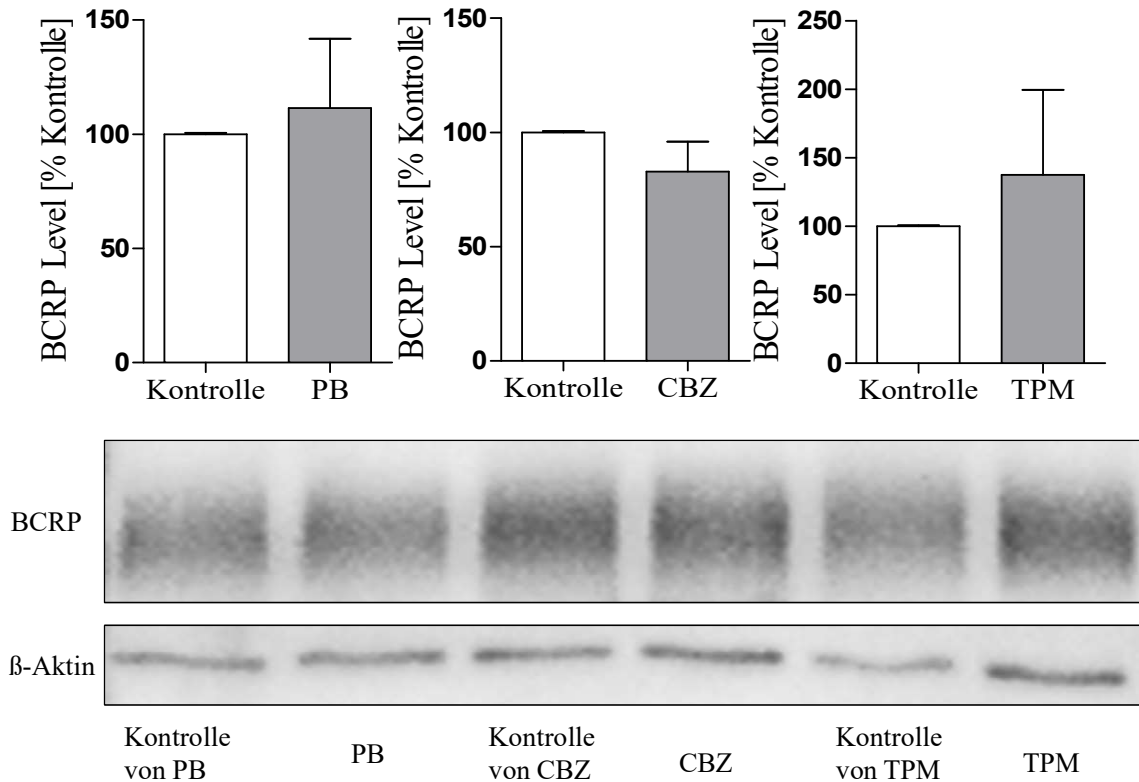


Abbildung 36: Proteinexpression des Transporters Pgp und der Ladekontrolle β -Aktin in porcinen Gehirnkapillaren ($n = 3$). Eine dreistündige Inkubation isolierter porciner Gehirnkapillaren mit $170 \mu\text{M}$ Phenobarbital (PB), $50 \mu\text{M}$ Carbamazepin (CBZ) und $60 \mu\text{M}$ Topiramat (TPM) führte zu keiner signifikanten Veränderung der BCRP-Proteinexpression. * = im Vergleich zur Kontrolle signifikant ($p < 0,05$).

2. Proteomanalysen Blut-Hirn-Schranken-assoziiierter Proteine während der Epileptogenese

2.1. Blut-Hirn-Schranken-assoziierte *pathways*

Im Rahmen der Dissertation von Andreas Walker wurde zur Identifizierung biologischer Signalwege hinsichtlich ihrer relativen Repräsentanz eine *Pathway*-Enrichment-Analyse anhand der web-basierten Programme *Genomatix* und *ConsensusPathDB* durchgeführt. Die *Pathway*-Enrichment-Analyse erfolgte anhand aller identifizierten Proteine des entsprechenden Zeitpunktes und Gewebes. Als signifikant reguliert betrachtet wurden *pathways*, die mindestens zwei regulierte Proteine beinhaltenen sowie ein Signifikanzniveau von kleiner als 0,05 aufwiesen.

Ein wichtiger Bestandteil einer funktionell aktiven BHS sind ABC-Transporter. Neben ihrer physiologischen Funktion, den Körper vor schädlichen Substanzen zu schützen, sind sie zudem involviert in der Pathologie von ZNS-Erkrankungen wie der Epilepsie (LÖSCHER u. POTSCHKA 2005c). Es konnte zudem festgestellt werden, dass eine anhaltende Anfallsaktivität eine vermehrte Expression einiger ABC-Transporter verursacht (VAN VLIET et al. 2005; HOFFMANN et al. 2006). Deshalb wurde in dieser Studie der Fokus auf die Regulation ABC-Transporter-assoziiierter *pathways* während der Epileptogenese gelegt.

Neben den ABC-Transporter-assoziierten *pathways* sind zudem *pathways* der Gruppe „Wachstumsfaktoren-assoziierte Signalwege“ in biologischen Prozessen der BHS während der Epileptogenese involviert. Ein typisches Merkmal einer TLE sowie eines zerebralen Insultes ist eine geschädigte BHS, in dessen Folge es zur Expression angiogenetischer Faktoren, Proliferation endothelialer Zellen sowie zur Angiogenese kommt (MORGAN et al. 2007; RIGAU et al. 2007; CHOPP et al. 2008). Einige Regulatoren der Angiogenese sind Wachstumsfaktoren (OTROCK et al. 2007), weshalb in die Proteomanalyse Wachstumsfaktoren-assoziierte Signalwege miteinbezogen wurden.

Es wird erneut darauf hingewiesen, dass bestimmte Proteine, die nicht nur in BHS-assoziierten Prozessen, sondern auch in inflammatorischen Vorgängen der Epileptogenese involviert sind, bereits in der Dissertation von Andreas Walker aufgeführt und in einem anderen Kontext diskutiert wurden.

2.1.1. Wachstumsfaktoren-assoziierte *pathways*

In der frühen Post-Insult-Phase konnten im HC kein und im PHC sieben regulierte *pathways* dargestellt werden. Die Latenzphase umfasste im HC einen und im PHC 12 regulierte Wachstumsfaktoren-assoziierte *pathways*. Im HC konnten in der chronischen Phase zwei regulierte *pathways* nachgewiesen werden.

Im HC wurden sowohl in der Latenz- (*Paxillin*, $p = 0.048$) als auch in der chronischen Phase (*Paxillin*, $p = 0.008$; *Caveolin 1*, $p = 0.019$) regulierte Signalwege nachgewiesen, die an der Regulation des Wachstumsfaktors VEGF beteiligt sind (TAHIR et al. 2009; YANG et al. 2015).

In der Post-Insult-Phase sowie in der Latenzphase zeigte sich im PHC eine signifikante Regulierung von *pathways*, die mit der Regulierung Wachstumsfaktoren-assoziiierter Signalwege wie *Paxillin* (Post-Insult-Phase: $p = 0,010$), *Caveolin 1* (Post-Insult-Phase: $p = 0,017$ bzw. Latenzphase: $p = 0,039$), *Nitric oxide stimulates guanylate cyclase* (Post-Insult-Phase: $p = 0,015$) sowie *Vasoactive intestinal peptide* (Latenzphase: $p = 0,033$) in Verbindung stehen (XU et al. 2002; COLLADO et al. 2004; TAHIR et al. 2009; YANG et al. 2015). Des Weiteren konnten in der Post-Insult-Phase regulierte *pathways* von Wachstumsfaktoren wie *epidermal growth factor receptor (EGFR) interacts with phospholipase C-gamma* ($p = 0,047$) und *EGFR1* ($p = 0,050$) als auch in der Latenzphase *EGFR1* ($p = 0,001$ bzw. $p = 0,028$), *epidermal growth factor (EGF)-EGFR Signaling Pathway* ($p = 0,017$) und *VEGFR3 signaling in lymphatic endothelium* ($p = 0,007$ bzw. $p = 0,040$) identifiziert werden. In der chronischen Phase wurde im PHC kein signifikantes Enrichment Wachstumsfaktoren-assoziiierter *pathways* nachgewiesen.

Die regulierten Wachstumsfaktoren-assoziierte Signalwege im HC und PHC mit den dazugehörigen Proteinen sind in Tabelle 7 dargestellt.

Tabelle 7: Regulierte Wachstumsfaktoren-assoziierte *pathways*

p-Wert	<i>pathway</i>	Quelle	Proteine
Hippocampus			
10 Tage nach SE			
0.048	Paxillin	Genomatix	KNG1, PLCG1, GNB2L1, FLNA, ITGB2, PTK2B, TLN1, VCL
8 Wochen nach SE			
0.008	Paxillin	Genomatix	ITGB1, MARCKSL1
0.019	Caveolin 1	Genomatix	ITGB1, ANXA2
parahippocampaler Cortex			
2 Tage nach SE			
0.010	Paxillin	Genomatix	CDC42, CTTN, FLNA, ITGB2, ITGB1, PTK2B, MCAM, GNB2L1
0.015	Nitric oxide stimulates guanylate cyclase	Reactome	ITPR1; PRKG2; GUCY1B3
0.017	Caveolin 1	Genomatix	PRKCA, FLNA, ITGB1, PRKCE, SCP2, TOLLIP, ANXA2, TXNRD1, ALB
0.021	Signaling by ERBB2	Reactome	PRKCA; RPS27A; PRKCE; CAMK4; CDC37; STUB1; PRKAR1B; YWHAB; ITPR1
0.047	EGFR interacts with phospholipase C-gamma	Reactome	PRKCA; ITPR1; PRKCE; CAMK4; PRKAR1B
0.047	PLCG1 events in ERBB2 signaling	Reactome	PRKCA; ITPR1; PRKCE; CAMK4; PRKAR1B
0.050	EGFR1	NetPath	MVP; ITGB1; ACTN1; ANXA2; ANXA4; TOLLIP; SLC38A2; PRKCA; ALB; RPL30; RASA1; MINK1; PTK2B; CTTN; TAGLN2; VIM; YWHAZ; PTPN6; SH3GL3; CDC42

Tabelle 7: Regulierte Wachstumsfaktoren-assoziierte *pathways*

p-Wert	pathway	Quelle	Proteine
parahippocampaler Cortex			
10 Tage nach SE			
0.001	EGFR1	NetPath	ANXA1; ACP1; HRAS; RPLP0; PTK2B; DNMI; ADAM17; CRK; STIP1; TLN1; ADRBK1; SH3GL3; SH3GL2; YWHAZ; PEBP1; STAM; CALM1; HNRNPR; MYH9; RASA1; GSN; SH3KBP1; MVP; ANXA2; RAB5A; ANXA4; MINK1; PRKCA; SFPQ; ITGB1;PTPN6; ACTN1; TOLLIP; ABI1; ALB; MYO6; RPL30; VIM; DDX6; TOM1L2; PTRF; WBP2; ASAP1; CDC42
0.007	VEGFR3 signaling in lymphatic endothelium	NCI-nature	CRK, ITGB1, ITGA1, PRRT2, ITGA5, GRB2
0.017	EGF-EGFR Signaling Pathway	Wikipathways	PEBP1; STMN1; PRKCA; HRAS; ABI1; SH3KBP1; RAB5A; PTK2B; CDC42; SYNJ1; RASA1; CRK; DNMI; STAM; ASAP1; SH3GL3; SH3GL2
0.028	EGFR1	Genomatix	CRK, ITGB1, SLK, CDC42, MARCKSL1, FLNA, ITGB2, PTK2B, TLN1, MCAM, PPAP2B
0.030	EGFR interacts with phospholipase C-gamma	CellMap	PRKCA, CRK, ASAP1, DNMI, RASA1, SH3GL2, RAB5A, SNCA, SH3GL3, SH3KBP1, CDC42, PTK2B, ABI1, PTPN6, GRB2, HRAS, YWHAB
0.032	Internalization of ErbB1	NCI-nature	SYNJ1, DNMI, SH3GL2, RAB5A, SH3KBP1, CDC42, GRB2, HRAS
0.033	Vasoactive intestinal peptide	Genomatix	ISYNA1, STMN1, KCNMA1, ENO2, CALB1
0.039	Caveolin 1	Genomatix	PRKCA, DNMI, ITGB1, PRKCE, ROCK2, ANXA2, PTRF, ITGA1, ALB, FLNA, SCP2, TOLLIP, TXNRD1
0.040	VEGFR3 signaling in lymphatic endothelium	PID	ITGB1; ITGA1; ITGA5; CRK
0.044	PLCG1 events in ERBB2 signaling	Reactome	CALM1; PRKCA; PRKCE; CAMK4; PRKAR2A; PRKAR1B; ITPR1; ADRBK1
0.044	EGFR interacts with phospholipase C-gamma	Reactome	CALM1; PRKCA; PRKCE; CAMK4; PRKAR2A; PRKAR1B; ITPR1; ADRBK1
0.044	Signaling by EGFRvIII in Cancer Signaling by EGFR in Cancer Signaling by Ligand-Responsive EGFR Variants in Cancer	Reactome	ITPR1; CALM1; PRKCA; SH3KBP1; HRAS; RPS27A; PRKCE; CAMK4; CDC37; PRKAR2A; CDC42; PRKAR1B; ADAM17; YWHAB; STAM; ADRBK1; SH3GL2

Tabelle 7: Regulierte Wachstumsfaktoren-assoziierte *pathways* im Hippocampus [zehn Tage nach Status epilepticus (SE)] und parahippocampalen Cortex (zwei, zehn Tage und acht Wochen nach SE). Die *Pathway*-Analyse erfolgte anhand der bioinformatischen Tools *Genomatix* und *ConsensusPathDB*. Der Schwellenwert für die *Pathway*-Analyse lag bei einem p-Wert von $p < 0,05$ und bei einer Schnittmenge von mindestens zwei regulierten Proteinen.

2.1.2. ABC-Transporter-assoziierte *pathways*

Sowohl in der Post-Insult- als auch in der chronischen Phase konnten im HC keine regulierten ABC-Transporter-assoziierten *pathways* nachgewiesen werden. Im HC konnte in der Latenzphase ein regulierter ABC-Transporter-assoziiierter *pathway* dargestellt werden.

Im PHC konnten in der Post-Insult-Phase und in der Latenzphase jeweils ein sowie in der chronischen Phase zwei regulierte *pathways* dargestellt werden.

Zu allen drei Zeitpunkten im PHC und im HC in der Latenzphase konnten regulierte Signalwege nachgewiesen werden, die in den zellulären Transportprozessen von Cholesterol involviert sind (DEAN et al. 2001a). Dazu zählen *pathways* wie *ATP binding cassette, sub family A* [Post-Insult-Phase: $p = 0,001$ (PHC) bzw. Latenzphase: $0,010$ (PHC)] und *ATP binding cassette, sub family G* [Latenzphase: $p = 0,016$ (HC) bzw. chronische Phase: $0,013$ (PHC)]. Der *pathway ATP binding cassette, sub family G* ist zudem involviert in die Absorption von Wirkstoffen und Xenobiotika im Dünndarm und in deren Elimination in der Leber und Niere (MALIEPAARD et al. 2001). Außerdem kann er einen Einfluss auf den Transport von Substanzen zwischen Blut und Gehirn an der BHS haben (NICOLAZZO u. KATNENI 2009). In der chronischen Phase zeigte sich im PHC eine Regulation des *pathways ATP binding cassette, sub family C* ($p = 0,001$). Er ist beteiligt an der Absorption, Verteilung und Eliminierung von Metaboliten und Wirkstoffen sowie an der Regulierung des Eisentransports. Des Weiteren ist er involviert in Prozesse der Signaltransduktion (DEAN et al. 2001a; DALVI et al. 2014).

Die regulierten ABC-Transporter-assoziierten *pathways* im HC und im PHC mit den dazugehörigen Proteinen werden in Tabelle 8 gezeigt.

Tabelle 8: Regulierte ABC-Transporter-assoziierte *pathways*

p-Wert	<i>pathway</i>	Quelle	Proteine
Hippocampus			
10 Tage nach SE			
0.016	ATP binding cassette, sub family G (white)	Genomatix	ATIC, APOE, ABCA1
parahippocampaler Cortex			
2 Tage nach SE			
0.001	ATP binding cassette, sub family A (ABC1)	Genomatix	PRKCA, CDC42, PLTP, CAMK4, APOE, SCP2
10 Tage nach SE			
0.010	ATP binding cassette, sub family A (ABC1)	Genomatix	PRKCA, PLTP, APOE, CDC42, CAMK4, SCP2, MIF
8 Wochen nach SE			
0.001	ATP binding cassette, sub family C (CFTR/MRP)	Genomatix	RDX, EZR, GSTA1, SLC16A1, GCLC
0.013	ATP binding cassette, sub family G (WHITE)	Genomatix	ATIC, APOE, GSTP1

Tabelle 8: Regulierte ABC-Transporter assoziierte *pathways* im Hippocampus [zehn Tage nach Status epilepticus(SE)] und parahippocampalen Cortex (zwei, zehn Tage und acht Wochen nach SE). Die *Pathway*-Analyse erfolgte anhand der bioinformatischen Tools *Genomatix* und *ConsensusPathDB*. Im Hippocampus konnten zwei Tage und acht Wochen nach SE keine regulierten ABC-Transporter-assoziierten *pathways* nachgewiesen werden. Der Schwellenwert für die *Pathway*-Analyse lag bei einem p-Wert von $p < 0,05$ und bei einer Schnittmenge von mindestens zwei regulierten Proteinen.

2.2. Selektion und individuelle Expression Blut-Hirn-Schranken-assoziiierter Proteine

Mithilfe der *Pathway-Enrichment*-Analyse konnten BHS-assoziierte Proteine identifiziert werden. Ergänzend zur *Pathway-Enrichment*-Analyse wurden zur Identifizierung weiterer BHS-assoziiierter Proteine eine Hypothesen-gestützte Recherche und eine Schlagwortsuche in den Proteinlisten durchgeführt. Außerdem wurden die Proteinlisten auf der Grundlage eines Review-Artikels nach Tight Junction-assoziierten Proteinen durchsucht (HASELOFF et al. 2015).

2.2.1. Wachstumsfaktoren-assoziierte Proteine

Die Gruppe der Wachstumsfaktoren-assoziierten *pathways* enthielt 19 Proteine, die aufgrund ihrer relevanten Funktion in der Angiogenese näher betrachtet wurden.

Mithilfe einer Hypothesen-gestützte Analyse konnte das differentiell exprimierte Protein NCL zugehörig zu den Wachstumsfaktoren-assoziierten Proteine identifiziert werden (DING et al. 2012). NCL wirkt durch die Beeinflussung von Wachstumsfaktoren an der Regulation der Angiogenese mit (KOUTSIOUMPA et al. 2012). NCL zeigte eine vermehrte Expression sowohl im HC und im PHC in der Post-Insult- als auch in der Latenzphase (Tabelle 9, Tabelle 10, Abbildung 37 A-D).

Das Protein *myosin-9* (MYH9) ist involviert in die Reorganisation des Zytoskeletts und spielt eine essentielle Rolle in der Vermittlung der angiogenetischen Funktion von NCL (HUANG et al. 2006). Es konnte eine Heraufregulierung von MYH9 im HC und im PHC während der Latenzphase festgestellt werden (Tabelle 9, Tabelle 10, Abbildung 37 C, D).

ANXA1 und ANXA2 sind Proteine, die calciumabhängig an Phospholipide in der Zellmembran binden können. Die Funktionen von ANXA1 und ANXA2 bestehen unter anderem in der Reparatur und Fusion von Membranen sowie im Vesikel-Trafficking (MCNEIL et al. 2006). ANXA2 zeigte in beiden Geweben zu allen Zeitpunkten eine deutliche Heraufregulierung (Tabelle 9, Tabelle 10, Abbildung 37 A-F), wohingegen ANXA1 nur in der Latenzphase im HC und im PHC vermehrt exprimiert war (Tabelle 9, Tabelle 10, Abbildung 37 C, D).

Die Proteine MCAM und PPAP2B sind an der Zelladhäsion sowie an Zell-Zell-Interaktionen beteiligt. MCAM zeigte im PHC eine Heraufregulierung zwei und zehn Tage nach SE (Tabelle 10, Abbildung 37 B, D), während PPAP2B nur in der Latenzphase vermehrt exprimiert war (Tabelle 10, Abbildung 37 D).

Der Laminin- und Kollagenrezeptor ITGA1 spielt eine Rolle in Anlagerungsprozessen in neuronalen und hämatopoetischen Zellen (DOUVILLE et al. 1992). Das Protein TLN1 ver-

knüpft durch Bindung von Integrinen die Plasmamembran mit wichtigen zytoskelettalen Strukturen (CRITCHLEY 2009). Während für ITGA1 im PHC in der Latenzphase eine Heraufregulation nachgewiesen werden konnte (Tabelle 10, Abbildung 37 D), war eine vermehrte Expression für TLN1 im HC in der Post-Insult- und der Latenzphase sowie im PHC ebenfalls zehn Tage nach SE als auch in der chronischen Phase festzustellen (Tabelle 9, Tabelle 10, Abbildung 37 A, C, D, F).

Die Proteine *ras GTP* (Guanosintriphosphat) *ase-activating protein 1* (RASA1), *GTPase HRas* (HRAS), CDC42 und RAB5A gehören zur Gruppe der GTPasen. Sie sind durch die Hydrolyse von GTP zu Guanosindiphosphat (GDP) an der Regulation verschiedener Zellfunktionen beteiligt (SCHEFFZEK u. AHMADIAN 2005). Das Protein *guanylate cyclase 1, soluble, beta 3* (GUCY1B3) katalysiert die Umwandlung von GTP zu cGMP. Für CDC42 konnten die zwei verschiedenen Transkripte CDC42-201 (Ensembl-IDs: ENSRNOT00000018118) und CDC42-202 (Ensembl-IDs: ENSRNOT00000029025) identifiziert werden. Während der Post-Insult- und der Latenzphase konnte im PHC für beide Transkripte eine Herunterregulierung festgestellt werden (Tabelle 10, Abbildung 37 B, D). Das Transkript CDC42-202 zeigte zudem eine signifikant erhöhte Expression im HC zwei Tage nach SE (Tabelle 9, Abbildung 37 A).

Die GTPase RASA1 war im HC und im PHC während der Post-Insult-Phase und auch im PHC in der Latenzphase herunterreguliert (Tabelle 9, Tabelle 10, Abbildung 37 A, B, D). Im PHC zeigten die kleinen GTPasen RAB5A und HRAS zehn Tage nach SE (Tabelle 10, Abbildung 37 D) sowie GUCY1B3 in der Post-Insult-Phase eine Herunterregulierung (Tabelle 10, Abbildung 37 B).

Für den Calcium-aktivierten Kalium-Ionenkanal *calcium-activated potassium channel subunit alpha-1* (KCNMA1) sowie für das an diversen zellulären Vorgängen beteiligte Protein *disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 17* (ADAM17) (GOOZ 2010) konnte im PHC ein signifikant verringerter Expressionslevel zehn Tage nach SE nachgewiesen werden (Tabelle 10, Abbildung 37 D). KCNMA1 stellt ein wichtiges Kontrollelement zellulärer Erregungszustände dar (SALKOFF et al. 2006).

Die Adaptorproteine CRK und GRB nehmen eine wichtige Rolle in der Zellmigration durch Signaltransduktion von Zelloberflächenrezeptoren wie VEGF ein (TARI u. LOPEZ-BERESTEIN 2001; STOLETOV et al. 2004; BRAIMAN u. ISAKOV 2015). Es konnte im PHC eine signifikante Reduktion für beide Proteine während der Latenzphase festgestellt werden (Tabelle 10, Abbildung 37 D).

Im PHC ließ sich für die Proteine *probable ATP-dependent RNA helicase DDX6* (DDX6) und

beta-adrenergic receptor kinase 1 (ADRBK1) in der Latenzphase eine Überexpression feststellen (Tabelle 10, Abbildung 37 D). DDX6 ist involviert in die Regulation, die Weiterverarbeitung, die Speicherung und den Abbau von mRNA (SCHELLER et al. 2007). ADRBK1 ist an der Regulation zahlreicher zellulärer Phänomene durch die Phosphorylierung unterschiedlicher Substrate involviert (RIBAS et al. 2007).

Der in der Biogenese von *Caveolae* beteiligte Faktor *RNA polymerase I and transkript release factor* (PTRF), zeigt in beiden Geweben eine Heraufregulation zehn Tage nach SE sowie in der chronischen Phase im PHC (Tabelle 9, Tabelle 10, Abbildung 37 C, D, F).

Tabelle 9 und Tabelle 10 zeigen die Wachstumsfaktoren-assoziierten Proteine im HC sowie im PHC mit ihren entsprechenden p-Werten, ihrem *fold change* und der Art ihrer Identifizierung.

Die graphische Darstellung der tierindividuellen Expression der ausgewählten Wachstumsfaktoren-assoziierten Proteine ist für beide Gewebe zu allen Zeitpunkten in Abbildung 37 dargestellt.

Tabelle 9: Regulierte Wachstumsfaktoren-assoziierte Proteine im Hippocampus

Gen-bezeichnung	Protein	p-Wert	max fold change	Identifiziert durch
2 Tage nach SE				
Rasa1*	Ras GTPase-activating protein 1	0.002	-3.5	Pathway-Analyse
Hras	GTPase HRas	0.003	1.3	Pathway-Analyse
Cdc42-202*	Cell division cycle protein 42	0.004	1.8	Pathway-Analyse
Ncl*	Nucleolin	0.007	2.0	Hypothesen-gestützte Recherche
Anxa2*	Annexin A2	0.011	2.1	Pathway-Analyse
Tln1*	Talin-1	0.028	1.7	Pathway-Analyse
Adrbk1	Beta-adrenergic receptor kinase 1	0.040	-1.2	Pathway-Analyse
Ptrf	Polymerase I and transcript release factor	0.059	1.4	Pathway-Analyse
Anxa1	Annexin A1	0.083	1.8	Pathway-Analyse
Ppap2b	Lipid phosphate phosphohydrolase 3	0.089	-1.2	Pathway-Analyse
Myh9	Myosin-9	0.113	1.2	Pathway-Analyse
Mcram	Cell surface glycoprotein MUC18	0.124	2.0	Pathway-Analyse
Adam17	Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 17	0.238	2.8	Pathway-Analyse
Cdc42-201	Cell division cycle protein 42	0.245	1.6	Pathway-Analyse
Itga1	Integrin alpha-1	0.357	1.4	Pathway-Analyse
Crk	Adapter molecule crk	0.369	1.3	Pathway-Analyse
Grb2	Growth factor receptor-bound protein 2	0.465	1.3	Pathway-Analyse
Rab5a	Ras-related protein Rab-5A	0.739	1.1	Pathway-Analyse
10 Tage nach SE				
Tln1*	Talin-1	0.007	3.2	Pathway-Analyse
Anxa1*	Annexin A1	0.009	4.0	Pathway-Analyse
Anxa2*	Annexin A2	0.009	3.7	Pathway-Analyse
Myh9*	Myosin-9	0.010	1.6	Pathway-Analyse
Ncl*	Nucleolin	0.016	2.0	Hypothesen-gestützte Recherche
Ptrf*	Polymerase I and transcript release factor	0.031	1.9	Pathway-Analyse
Hras	GTPase HRas	0.039	-1.3	Pathway-Analyse
Rab5a	Ras-related protein Rab-5A	0.057	1.3	Pathway-Analyse
Adam17	Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 17	0.085	8.6	Pathway-Analyse
Mcram	Cell surface glycoprotein MUC18	0.225	2.0	Pathway-Analyse
Adrbk1	Beta-adrenergic receptor kinase 1	0.319	-1.1	Pathway-Analyse
Cdc42-202	Cell division cycle protein 42	0.445	1.2	Pathway-Analyse
Ppap2b	Lipid phosphate phosphohydrolase 3	0.453	1.2	Pathway-Analyse
Itga1	Integrin alpha-1	0.634	1.2	Pathway-Analyse
Crk	Adapter molecule crk	0.751	1.1	Pathway-Analyse
Rasa1	Ras GTPase-activating protein 1	0.823	1.0	Pathway-Analyse
Grb2	Growth factor receptor-bound protein 2	0.884	-1.1	Pathway-Analyse
Cdc42-201	Cell division cycle protein 42	0.984	1.1	Pathway-Analyse

Fortsetzung Tabelle 9: Regulierte Wachstumsfaktoren-assoziierte Proteine im Hippocampus

Gen-bezeichnung	Protein	p-Wert	max fold change	Identifiziert durch
8 Wochen nach SE				
Anxa2*	Annexin A2	0.046	2.4	<i>Pathway</i> -Analyse
Cdc42-202	Cell division cycle protein 42	0.116	1.1	<i>Pathway</i> -Analyse
Ptrf	Polymerase I and transcript release factor	0.163	1.8	<i>Pathway</i> -Analyse
Grb2	Growth factor receptor-bound protein 2	0.243	1.0	<i>Pathway</i> -Analyse
Adrbk1	Beta-adrenergic receptor kinase 1	0.306	1.1	<i>Pathway</i> -Analyse
Ddx6	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX6	0.337	1.2	<i>Pathway</i> -Analyse
Rab5a	Ras-related protein Rab-5A	0.341	-1.1	<i>Pathway</i> -Analyse
Ppap2b	Lipid phosphate phosphohydrolase 3	0.348	1.1	<i>Pathway</i> -Analyse
Anxa1	Annexin A1	0.391	3.0	<i>Pathway</i> -Analyse
Ncl	Nucleolin	0.427	-1.3	Hypothesen-gestützte Recherche
Hras	GTPase HRas	0.475	-1.0	<i>Pathway</i> -Analyse
Tln1	Talin-1	0.499	1.4	<i>Pathway</i> -Analyse
Myh9	Myosin-9	0.581	1.3	<i>Pathway</i> -Analyse
Crk	Adapter molecule crk	0.733	-1.1	<i>Pathway</i> -Analyse
Cdc42-201	Cell division cycle protein 42	0.870	-1.0	<i>Pathway</i> -Analyse

Tabelle 9: Regulierte Wachstumsfaktoren-assoziierte Proteine im Hippocampus zwei Tage, zehn Tage und acht Wochen nach Status epilepticus (SE). Die Proteine wurden durch die *Pathway*-Analyse oder eine Hypothesen-gestützte Recherche identifiziert. * = differentiell exprimiert.

Tabelle 10: Regulierte Wachstumsfaktoren-assoziierte Proteine im parahippocampalen Cortex

Gen-bezeichnung	Protein	p-Wert	max fold change	Identifiziert durch
2 Tage nach SE				
Gucy1b3*	Guanylate cyclase soluble subunit beta-1	1.02E-06	-1.7	Pathway-Analyse
Anxa2*	Annexin A2	1.12E-06	3.0	Pathway-Analyse
Mcam*	Cell surface glycoprotein MUC18	0.001	2.0	Pathway-Analyse
Adrbk1	Beta-adrenergic receptor kinase 1	0.002	-1.2	Pathway-Analyse
Rab5a	Ras-related protein Rab-5A	0.003	-1.4	Pathway-Analyse
Cdc42-201*	Cell division cycle protein 42	0.003	-1.7	Pathway-Analyse
Rasa1*	Ras GTPase-activating protein 1	0.007	-2.1	Pathway-Analyse
Ncl*	Nucleolin	0.016	2.0	Hypothesen-gestützte Recherche
Cdc42-202*	Cell division cycle protein 42	0.019	-1.5	Pathway-Analyse
Hras	GTPase HRas	0.060	-1.2	Pathway-Analyse
Myh9	Myosin-9	0.063	1.4	Pathway-Analyse
Anxa1	Annexin A1	0.065	1.5	Pathway-Analyse
Itga1	Integrin alpha-1	0.089	1.3	Pathway-Analyse
Kcnma1	Calcium-activated potassium channel subunit alpha-1	0.103	-1.3	Pathway-Analyse
Tln1	Talin-1	0.127	1.5	Pathway-Analyse
Crk	Adapter molecule crk	0.136	-1.4	Pathway-Analyse
Ppap2b	Lipid phosphate phosphohydrolase 3	0.191	1.2	Pathway-Analyse
Ddx6	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX6	0.256	1.3	Pathway-Analyse
Adam17	Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 17	0.340	-1.4	Pathway-Analyse
Grb2	Growth factor receptor-bound protein 2	0.474	-1.2	Pathway-Analyse
Ptrf	Polymerase I and transcript release factor	0.709	1.1	Pathway-Analyse
10 Tage nach SE				
Ptrf*	Polymerase I and transcript release factor	2.74E-05	2.7	Pathway-Analyse
Anxa2*	Annexin A2	4.32E-05	4.4	Pathway-Analyse
Myh9*	Myosin-9	1.72E-04	2.0	Pathway-Analyse
Tln1*	Talin-1	3.36E-04	2.5	Pathway-Analyse
Anxa1*	Annexin A1	4.98E-04	4.6	Pathway-Analyse
Grb2*	Growth factor receptor-bound protein 2	0.001	-1.8	Pathway-Analyse
Rasa1*	Ras GTPase-activating protein 1	0.004	-2.5	Pathway-Analyse
Crk*	Adapter molecule crk	0.004	-2.1	Pathway-Analyse
Rab5a*	Ras-related protein Rab-5A	0.006	-1.5	Pathway-Analyse
Adrbk1*	Beta-adrenergic receptor kinase 1	0.008	1.5	Pathway-Analyse

Fortsetzung Tabelle 10: Regulierte Wachstumsfaktoren-assoziierte Proteine im parahippocampalen Cortex

Gen-bezeichnung	Protein	p-Wert	max fold change	Identifiziert durch
10 Tage nach SE				
Cdc42-201*	Cell division cycle protein 42	0.008	-1.9	Pathway-Analyse
Hras*	GTPase HRas	0.010	-1.6	Pathway-Analyse
Cdc42-202*	Cell division cycle protein 42	0.014	-1.7	Pathway-Analyse
Adam17*	Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 17	0.018	-3.3	Pathway-Analyse
Kcnma1*	Calcium-activated potassium channel subunit alpha-1	0.020	-1.5	Pathway-Analyse
Ppap2b*	Lipid phosphate phosphohydrolase 3	0.021	1.6	Pathway-Analyse
Ddx6*	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX6	0.027	1.5	Pathway-Analyse
Itga1*	Integrin alpha-1	0.032	1.7	Pathway-Analyse
Ncl*	Nucleolin	0.033	2.0	Hypothesen-gestützte Recherche
Mcam*	Cell surface glycoprotein MUC18	0.037	1.6	Pathway-Analyse
Gucy1b3	Guanylate cyclase soluble subunit beta-1	0.053	-1.4	Pathway-Analyse
8 Wochen nach SE				
Ptrf*	Polymerase I and transcript release factor	7.75E-05	3.0	Pathway-Analyse
Anxa2*	Annexin A2	7.96E-05	3.4	Pathway-Analyse
Rab5a	Ras-related protein Rab-5A	0.007	1.3	Pathway-Analyse
Tln1*	Talin-1	0.010	1.9	Pathway-Analyse
Grb2	Growth factor receptor-bound protein 2	0.063	-1.6	Pathway-Analyse
Ppap2b	Lipid phosphate phosphohydrolase 3	0.076	1.3	Pathway-Analyse
Anxa1	Annexin A1	0.082	1.7	Pathway-Analyse
Gucy1b3	Guanylate cyclase soluble subunit beta-1	0.119	1.4	Pathway-Analyse
Cdc42-202	Cell division cycle protein 42	0.223	1.1	Pathway-Analyse
Rasa1	Ras GTPase-activating protein 1	0.234	1.2	Pathway-Analyse
Hras	GTPase HRas	0.304	-1.1	Pathway-Analyse
Ncl	Nucleolin	0.319	1.3	Hypothesen-gestützte Recherche
Kcnma1	Calcium-activated potassium channel subunit alpha-1	0.415	1.1	Pathway-Analyse
Cdc42-201	Cell division cycle protein 42	0.522	-1.1	Pathway-Analyse
Adrbk1	Beta-adrenergic receptor kinase 1	0.596	1.1	Pathway-Analyse
Ddx6	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX6	0.668	1.1	Pathway-Analyse
Crk	Adapter molecule crk	0.866	-1.0	Pathway-Analyse
Myh9	Myosin-9	0.896	1.0	Pathway-Analyse

Tabelle 10: Regulierte Wachstumsfaktoren-assoziierte Proteine im parahippocampalen Cortex zwei Tage, zehn Tage und acht Wochen nach Status epilepticus (SE). Die Proteine wurden durch die Pathway-Analyse oder eine Hypothesen-gestützte Recherche identifiziert. * = differentiell exprimiert.

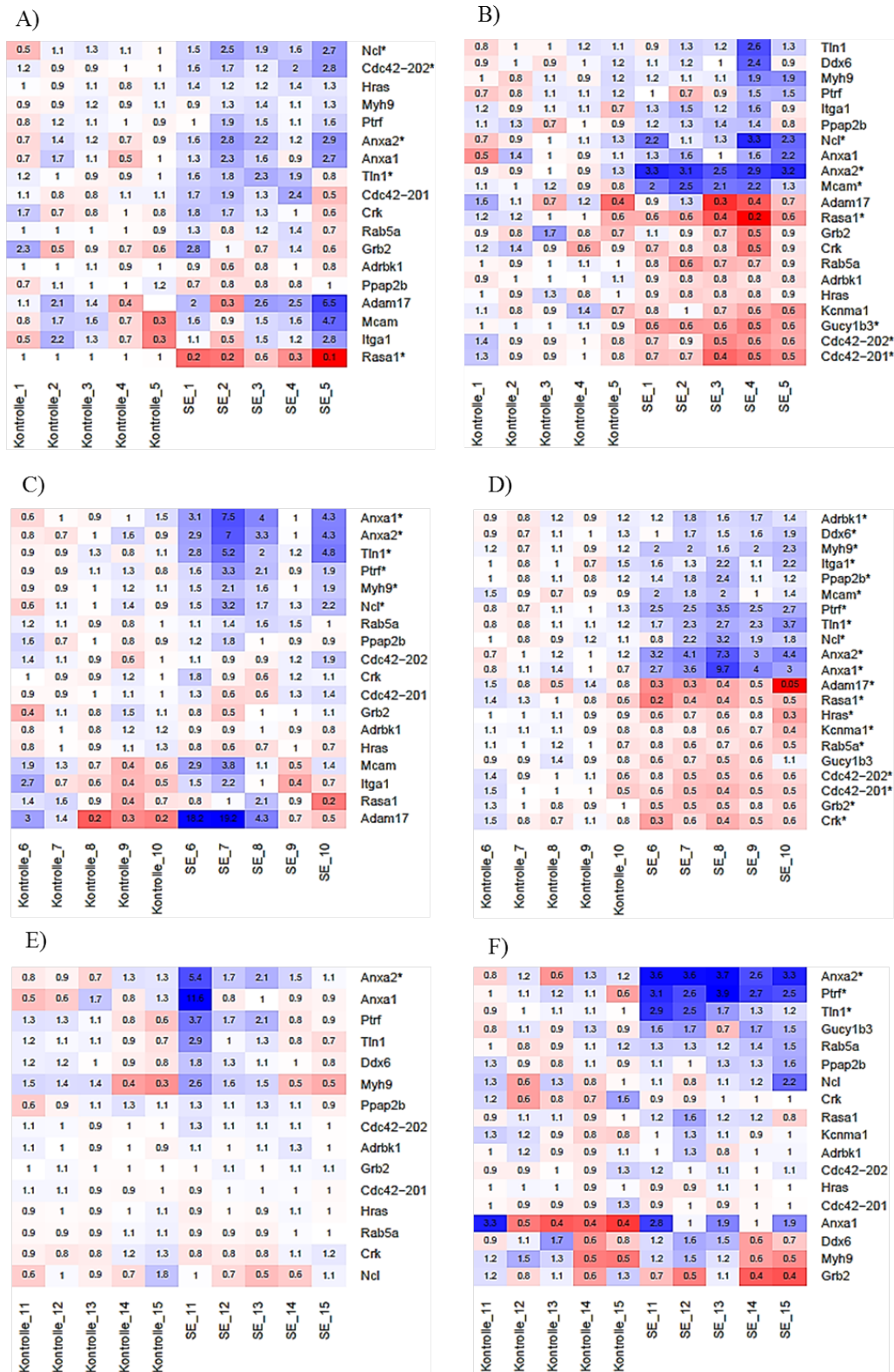


Abbildung 37: Expressionsanalyse regulierter Wachstumsfaktoren-assoziiierter Proteine im Hippocampus (A, C, E) und parahippocampalen Cortex (B, D, F) zwei Tage (A, B), zehn Tage (C, D) und acht Wochen (E, F) nach Status epilepticus (SE). Die Spalten und Zeilen der *Heatmaps* zeigen die differentiellen Proteinexpressionsdaten der Kontroll- und SE-Tiere zu den entsprechenden *Pathway*-Proteinen. Der Farbverlauf gibt die individuellen *fold changes* entsprechend der Zellenwerte wieder (rot = herunterreguliert; blau = heraufreguliert; weiß = nicht reguliert). Die Anfertigung der *Heatmaps* erfolgte mittels R. * = differentiell exprimiert.

2.2.2. ABC-Transporter-assoziierte Proteine

Aus den *pathways* der Gruppe „ABC-Transporter-assoziierte *pathways*“ konnten die Proteine *radixin* (RDX) und *eZRin* (EZR) identifiziert werden, die unter anderem an der Regulation als auch an der Verankerung verschiedener ABC-Transporter in der Zellmembran beteiligt sind (YANG et al. 2007; NAKANO et al. 2013; YANO et al. 2013a). Das Zytoskelett-Protein RDX zeigte eine Heraufregulierung im HC in der Latenzphase und im PHC in der chronischen Phase (Tabelle 11, Tabelle 12, Abbildung 38 C, F). EZR, ein weiteres Zytoskelettprotein, war im PHC zu allen drei Zeitpunkten vermehrt exprimiert (Tabelle 12, Abbildung 38 B, D, F). Der ABC-Transporter *ATP-binding cassette sub-family A member 1* (ABCA1) nimmt als Cholesterin-Efflux-Transporter eine Funktion im Lipidtransport und –stoffwechsel ein (DEAN et al. 2001a). Das Transporterprotein ABCA1 war im HC zehn Tage nach SE heraufreguliert (Tabelle 11, Abbildung 38 C).

Um weitere regulierte ABC-Transporter nachweisen zu können, wurden die differentiell exprimierten Proteine jedes Zeitpunktes und Gewebes mit dem Suchbegriff „abc“ durchsucht. Dadurch konnten zusätzlich zum ABC-Transporter ABCA1 die Transporter *ATP-binding cassette sub-family B member 1A* (ABCB1A), *ATP-binding cassette sub-family B member 7* (ABCB7) und *ATP-binding cassette sub-family D member 3* (ABCD3) als differentiell exprimierte Proteine identifiziert werden. ABCB1A codiert neben *ATP-binding cassette sub-family B member 1B* (ABCB1B) den Efflux-Transporter Pgp der Maus und der Ratte. Der Transporter kontrolliert die BHS-Permeabilität einer Vielzahl hydrophober, amphipathischer Medikamente (SCHINKEL 1999). Wir konnten im PHC während der Latenzphase eine signifikant erhöhte Expression von ABCB1A nachweisen (Tabelle 12, Abbildung 38 D).

Der Transporter ABCB7 spielt eine Rolle in der Eisen-Homöostase in Mitochondrien (TAKETANI et al. 2003). Eine Heraufregulierung dieses Proteins ist in der chronischen Phase im PHC feststellbar (Tabelle 12, Abbildung 38 F).

Das Membranprotein ABCD3 ist am peroxisomalen Transport langkettiger Fettsäuren involviert (CONTRERAS et al. 1996). Es zeigt im HC eine erhöhte Expression in der Latenzphase (Tabelle 11, Abbildung 38 D).

Tabelle 11 und Tabelle 12 zeigen die ABC-Transporter-assoziierten Proteine im HC sowie im PHC mit ihren entsprechenden p-Werten, ihrem *fold change* und der Art ihrer Identifizierung. Die graphische Darstellung der tierindividuellen Expression der ausgewählten ABC-Transporter-assoziierten Proteine ist für beide Gewebe zu allen Zeitpunkten in Abbildung 38 dargestellt.

Tabelle 11: Regulierte ABC-Transporter-assoziierte Proteine im Hippocampus

Gen-bezeichnung	Protein	p-Wert	max fold change	Identifiziert durch
2 Tage nach SE				
Abcb7	ATP-binding cassette sub-family B member 7, mitochondrial	0.290	-1.1	Schlagwortsuche in den Proteinlisten
Abcd3	ATP-binding cassette sub-family D member 3	0.644	1.2	Hypothesen-gestützte Recherche
Abca1	ATP-binding cassette sub-family A member 1	0.874	1.0	Schlagwortsuche in den Proteinlisten
Abcb1a	Multidrug resistance protein 1a	0.898	1.0	Schlagwortsuche in den Proteinlisten
Ezr	Ezrin	0.926	1.1	<i>Pathway</i> -Analyse
Rdx	Radixin	0.942	-1.1	<i>Pathway</i> -Analyse
10 Tage nach SE				
Abcd3*	ATP-binding cassette sub-family D member 3	0.001	1.8	Schlagwortsuche in den Proteinlisten
Abca1*	ATP-binding cassette sub-family A member 1	0.010	1.6	<i>Pathway</i> -Analyse
Rdx*	Radixin	0.026	2.3	<i>Pathway</i> -Analyse
Abcb1a	Multidrug resistance protein 1a	0.076	1.7	Schlagwortsuche in den Proteinlisten
Ezr	Ezrin	0.304	1.4	<i>Pathway</i> -Analyse
Abcb7	ATP-binding cassette sub-family B member 7, mitochondrial	0.428	-1.1	Schlagwortsuche in den Proteinlisten
8 Wochen nach SE				
Rdx	Radixin	0.143	1.3	<i>Pathway</i> -Analyse
Ezr	Ezrin	0.395	1.4	<i>Pathway</i> -Analyse
Abcb7	ATP-binding cassette sub-family B member 7, mitochondrial	0.693	1.0	Schlagwortsuche in den Proteinlisten

Tabelle 11: Regulierte ABC-Transporter-assoziierte Proteine im Hippocampus (HC) zwei Tage, zehn Tage und acht Wochen nach Status epilepticus (SE). Die Identifizierung der Proteine erfolgte anhand einer *Pathway*-Analyse sowie einer Schlagwortsuche in den Proteinlisten. * = differentiell exprimiert.

Tabelle 12: Regulierte ABC-Transporter-assoziierte Proteine im parahippocampalen Cortex

Gen-bezeichnung	Protein	p-Wert	max fold change	Identifiziert durch
2 Tage nach SE				
Ezr*	Ezrin	0.011	2.0	<i>Pathway-Analyse</i>
Abcd3	ATP-binding cassette sub-family D member 3	0.113	-1.1	Schlagwortsuche in den Proteinlisten
Abcb1a	Multidrug resistance protein 1a	0.247	1.2	Schlagwortsuche in den Proteinlisten
Rdx	Radixin	0.441	1.2	<i>Pathway-Analyse</i>
Abca1	ATP-binding cassette sub-family A member 1	0.624	-1.0	<i>Pathway-Analyse</i>
10 Tage nach SE				
Abcd3	ATP-binding cassette sub-family D member 3	0.006	-1.2	Schlagwortsuche in den Proteinlisten
Ezr*	Ezrin	0.008	2.6	<i>Pathway-Analyse</i>
Abcb1a*	Multidrug resistance protein 1a	0.010	1.7	Schlagwortsuche in den Proteinlisten
Rdx	Radixin	0.064	1.7	<i>Pathway-Analyse</i>
Abca1	ATP-binding cassette sub-family A member 1	0.428	1.1	<i>Pathway-Analyse</i>
8 Wochen nach SE				
Rdx*	Radixin	1.029E-06	2.0	<i>Pathway-Analyse</i>
Abcb7*	ATP-binding cassette sub-family B member 7, mitochondrial	4.191E-05	1.5	Schlagwortsuche in den Proteinlisten
Ezr*	Ezrin	0.0031	1.5	<i>Pathway-Analyse</i>

Tabelle 12: Regulierte ABC-Transporter-assoziierte Proteine im parahippocampalen Cortex zwei Tage, zehn Tage und acht Wochen nach Status epilepticus (SE). Die Proteine wurden durch die *Pathway*-Analyse oder eine Schlagwortsuche in den Proteinlisten identifiziert. * = differentiell exprimiert.

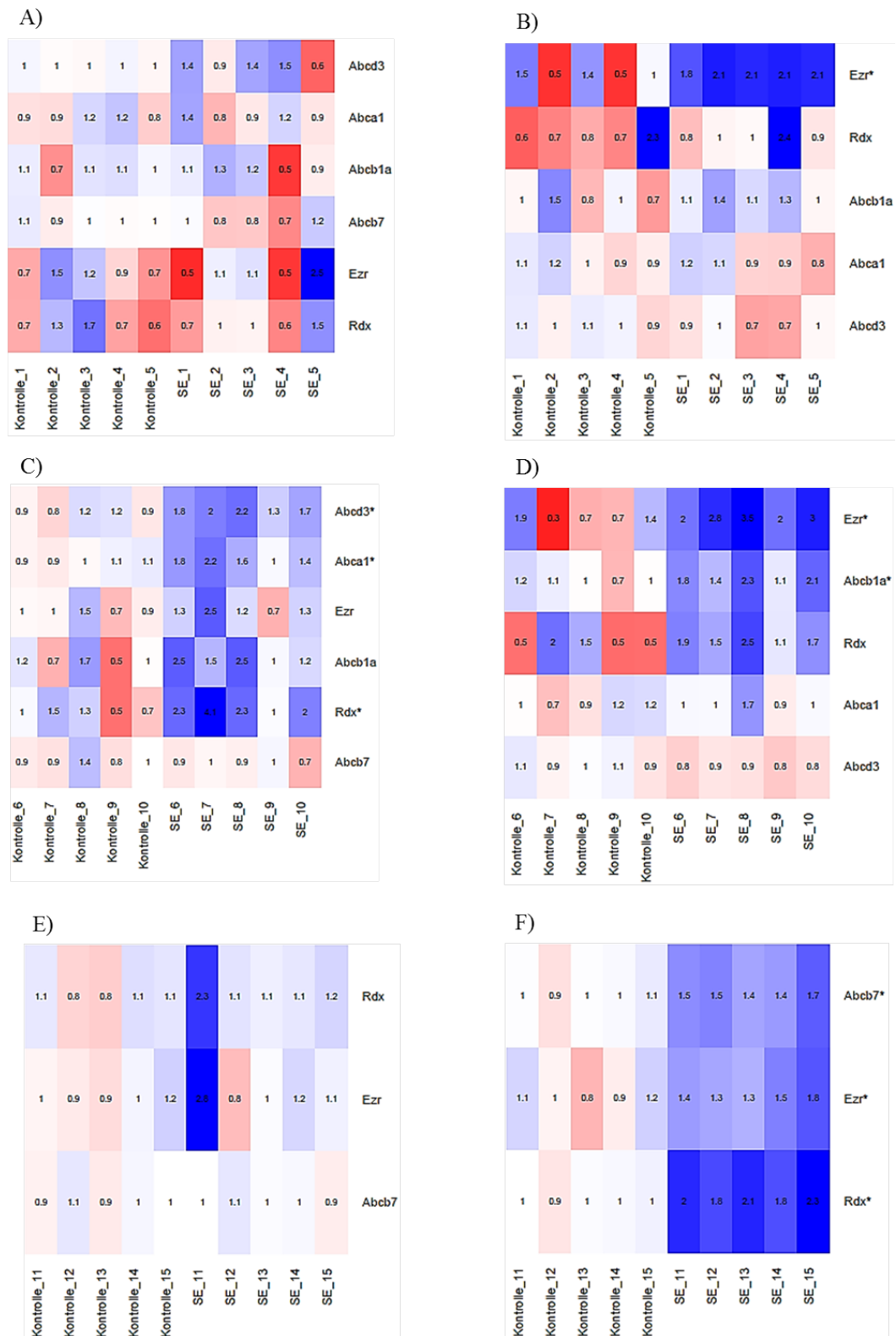


Abbildung 38: Expressionsanalyse regulierter ABC-Transporter-assoziiierter Proteine im Hippocampus (A, C, E) und parahippocampalen Cortex (B, D, F) zwei Tage (A, B), zehn Tage (C, D) und acht Wochen (E, F) nach Status epilepticus (SE). Die Spalten und Zeilen der *Heatmaps* zeigen die differentiellen Proteinexpressionsdaten der Kontroll- und SE-Tiere zu den entsprechenden *Pathway*-Proteinen. Der Farbverlauf gibt die individuellen *fold changes* entsprechend der Zellenwerte wieder (rot = herunterreguliert; blau = heraufreguliert, weiß = nicht reguliert). Die Anfertigung der *Heatmaps* erfolgte mittels R. * = differentiell exprimiert.

2.2.3. Tight Junction-assoziierte Proteine

Eine durch Angiogenese vermehrte Vaskularisierung geht einher mit dem Verlust von Tight-Junction-Proteinen in das Gehirnparenchym, infolgedessen es zu einer erhöhten Permeabilität der BHS kommt (VAN VLIET et al. 2007a). Im Rahmen dieses Projektes wurden Tight-Junction-Proteine der differentiell exprimierten Proteine jedes Gewebes und Zeitpunktes gesucht. Die Proteine *claudin domain-containing protein 1* (CLDND1) und JAM3 zählen zu den Tight Junction-assoziierten Transmembranproteinen. CLDND1 zeigt in der Latenzphase im PHC eine Heraufregulierung (Tabelle 14, Abbildung 39 D).

Es konnte für JAM3 eine vermehrte Expression im HC zwei und zehn Tage nach SE sowie im PHC acht Wochen nach SE nachgewiesen werden (Tabelle 13, Tabelle 14, Abbildung 39 A, C, F). Das Adhäsionsprotein ESAM gehört wie JAM3 zu der Immunoglobulin-Superfamilie (MARTIN-PADURA et al. 1998; HIRATA et al. 2001). ESAM zeigte in der Post-Insult-Phase im HC eine vermehrte Expression (Tabelle 13, Abbildung 39 A).

Die Tight Junction-assoziierten Zytoplasmaproteine TJP1 und TJP2 zeigten acht Wochen nach SE im PHC (Tabelle 14, Abbildung 39 F) eine Heraufregulierung. TJP2 war zudem zehn Tage nach SE im HC vermehrt exprimiert (Tabelle 13, Abbildung 39 C).

Tabelle 13 und Tabelle 14 zeigen die Tight Junction-assoziierten Proteine im HC sowie im PHC mit ihren entsprechenden p-Werten, ihrem *fold change* und der Art ihrer Identifizierung. Die graphische Darstellung der tierindividuellen Expression der ausgewählten Tight Junction-assoziierten Proteine ist für beide Gewebe zu allen Zeitpunkten in Abbildung 39 dargestellt.

Tabelle 13: Regulierte Tight Junction-assoziierte Proteine im Hippocampus

Gen-bezeichnung	Protein	p-Wert	max fold change	Identifiziert durch
2 Tage nach SE				
Esam*	Endothelial cell-selective adhesion molecule	0.010	1.9	HASELOFF et al. 2015
Jam3*	Junctional adhesion molecule C	0.010	1.8	HASELOFF et al. 2015
Tjp2	Tight junction protein ZO-2	0.421	1.2	HASELOFF et al. 2015
Tjp1	Tight junction protein ZO-1	0.616	-1.1	HASELOFF et al. 2015
10 Tage nach SE				
Tjp1	Tight junction protein ZO-1	0.006	1.4	HASELOFF et al. 2015
Tjp2*	Tight junction protein ZO-2	0.011	1.6	HASELOFF et al. 2015
Jam3*	Junctional adhesion molecule C	0.043	1.6	HASELOFF et al. 2015
Esam	Endothelial cell-selective adhesion molecule	0.149	1.2	HASELOFF et al. 2015
8 Wochen nach SE				
Tjp1	Tight junction protein ZO-1	0.092	1.3	HASELOFF et al. 2015
Tjp2	Tight junction protein ZO-2	0.211	1.4	HASELOFF et al. 2015
Jam3	Junctional adhesion molecule C	0.769	1.0	HASELOFF et al. 2015

Tabelle 13: Regulierte Tight Junction-assoziierte Proteine im Hippocampus zwei Tage, zehn Tage und acht Wochen nach Status epilepticus (SE). * = differentiell exprimiert.

Tabelle 14: Regulierte Tight Junction-assoziierte Proteine im parahippocampalen Cortex

Gen-bezeichnung	Protein	p-Wert	max fold change	Identifiziert durch
2 Tage nach SE				
Tjp1	Tight junction protein ZO-1	0.065	1.3	HASELOFF et al. 2015
Cldnd1	Claudin domain-containing protein 1	0.421	1.1	HASELOFF et al. 2015
Esam	Endothelial cell-selective adhesion molecule	0.443	1.5	HASELOFF et al. 2015
10 Tage nach SE				
Cldnd1*	Claudin domain-containing protein 1	0.008	2.1	HASELOFF et al. 2015
Tjp1	Tight junction protein ZO-1	0.060	1.3	HASELOFF et al. 2015
Esam	Endothelial cell-selective adhesion molecule	0.440	1.4	HASELOFF et al. 2015
8 Wochen nach SE				
Jam3*	Junctional adhesion molecule C	2.76E-04	2.1	HASELOFF et al. 2015
Tjp1*	Tight junction protein ZO-1	8.08E-04	1.9	HASELOFF et al. 2015
Tjp2*	Tight junction protein ZO-2	9.02E-04	2.2	HASELOFF et al. 2015

Tabelle 14: Regulierte Tight Junction-assoziierte Proteine im parahippocampalen Cortex zwei Tage, zehn Tage und acht Wochen nach Status epilepticus (SE). * = differentiell exprimiert.

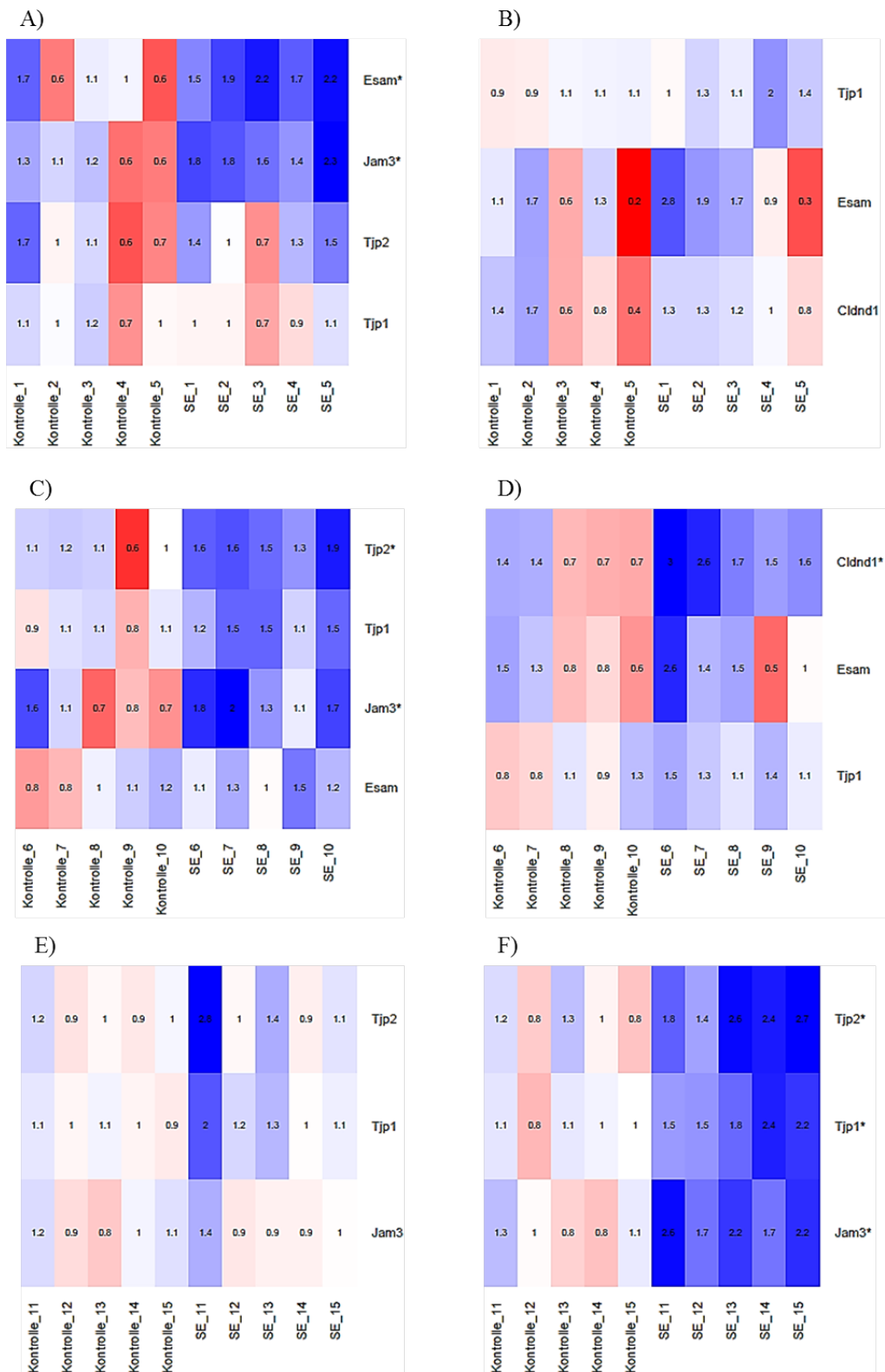


Abbildung 39: Expressionsanalyse regulierter Tight Junction-assoziiierter Proteine im Hippocampus (A, C, E) und parahippocampalen Cortex (B, D, F) zwei Tage (A, B), zehn Tage (C, D) und acht Wochen (E, F) nach Status epilepticus (SE). Die Spalten und Zeilen der *Heatmaps* zeigen die differentiellen Proteinexpressionsdaten der Kontroll- und SE-Tiere zu den entsprechenden *Pathway*-Proteinen. Der Farbverlauf gibt die individuellen *fold changes* entsprechend der Zellenwerte wieder (rot = herunterreguliert; blau = heraufreguliert; weiß = nicht reguliert). Die Anfertigung der *Heatmaps* erfolgte mittels R. * = differentiell exprimiert.

2.3. Immunhistochemische Validierung von *nucleolin*

Im Rahmen dieser Studie wurde die immunhistochemische Färbung von NCL an Paraffinschnitten von Kontroll- und SE-Tieren etabliert. So konnte exemplarisch die zelluläre und anatomische Verteilung des differentiell exprimierten Proteins NCL im HC und im PHC zehn Tage nach SE dargestellt werden. Um eine abschließende Validierung der Proteindaten durchführen zu können, muss in der Zukunft die immunhistochemische Färbung an weiteren Kontroll- und SE-Tieren zu allen Zeitpunkten erfolgen.

Die zelluläre NCL-Expression weist auf eine erhöhte Expression von NCL im HC und im PHC zehn Tage nach SE hin (Abbildung 40 A-D). Darüber hinaus zeigte sich qualitativ eine vermehrte Expression von NCL in den Gefäßendothelzellen von SE-Tieren im Vergleich zu den Kontrolltieren (Abbildung 40 E, F). Zudem konnte sowohl in Kontroll- als auch in SE-Tieren eine nukleäre Färbung von Neuronen festgestellt werden (Abbildung 40 A-F). Auch Zellen mit gliaähnlicher Morphologie zeigten eine positive Reaktion des Zytoplasmas sowie des Zellkerns (Abbildung 40 E).

Eine abschließende Quantifizierung der Expression von NCL auf zellulärer Ebene steht noch aus.

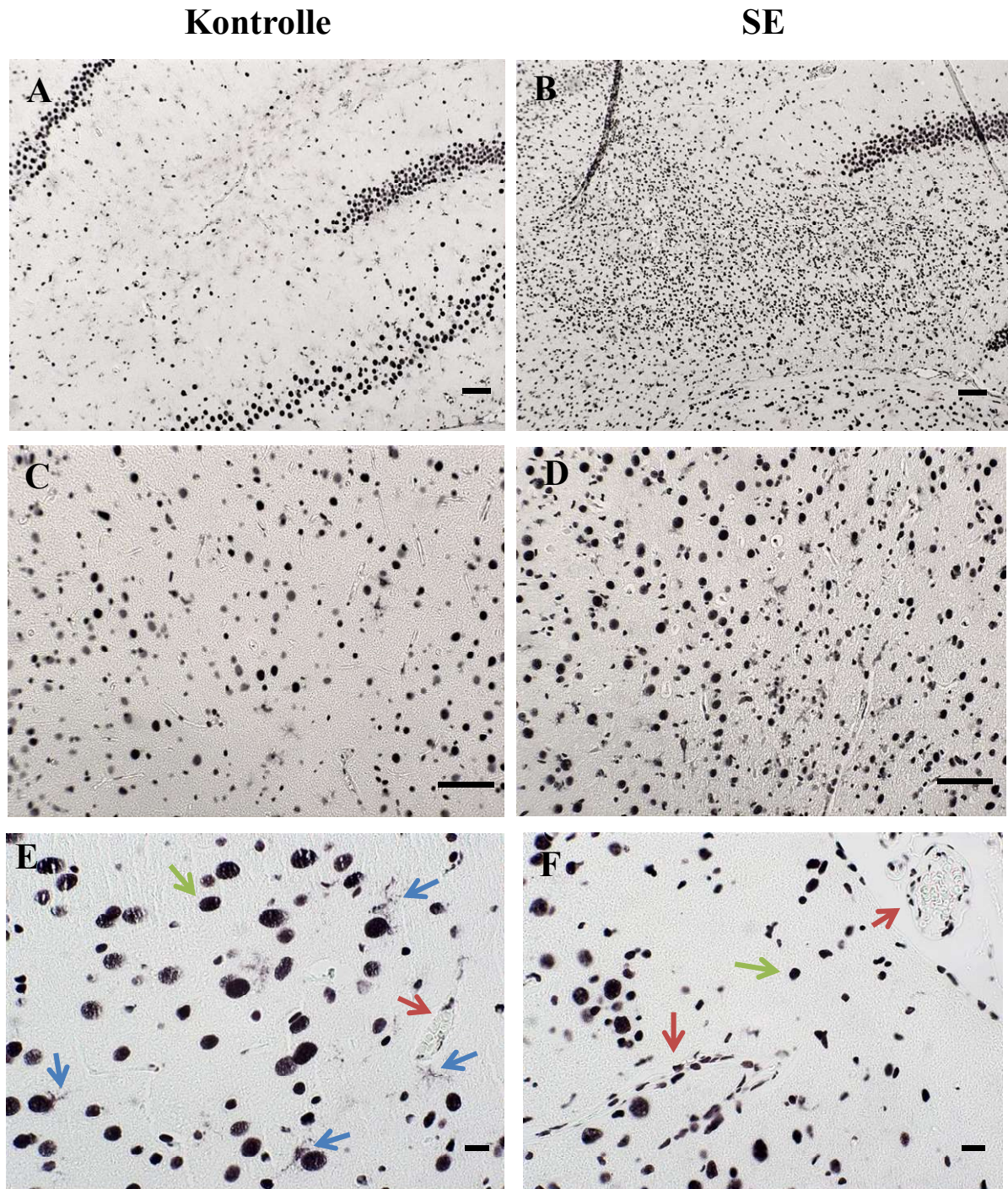


Abbildung 40: Immunhistochemische Färbung von *nucleolin* im Hippocampus (A, C, E) und im parahippocampalen Cortex (B, D, F) zehn Tage nach SE. Im Vergleich zu den Kontrolltieren zeigte sich im Hippocampus und im parahippocampalen Cortex der SE-Tiere (B, D) eine vermehrte Expression von *nucleolin* (A, C). Qualitativ konnte eine vermehrte nukleäre Färbung von Gefäßendothelzellen der SE-Tiere (F, rote Pfeile) im Vergleich zu den Kontrolltieren (E, roter Pfeil) dargestellt werden. Außerdem zeigten die Kerne von Neuronen eine positive Immunreaktion (F, grüner Pfeil). Auch Zellen mit gliaähnlicher Morphologie zeigten eine deutliche Färbung des Kerns sowie des Zytoplasmas (E, blauer Pfeil). Maßstab = 50 µm (A-D) und 10 µm (E,F).

VI. DISKUSSION

1. Regulation von ABC-Transportern durch Antiepileptika

Epilepsien zählen sowohl bei Hunden und Katzen als auch beim Menschen zu den häufigsten chronisch neurologischen Erkrankungen (SANDER u. SHORVON 1996; SCHNEBLE 2003; SMITH BAILEY u. DEWEY 2009; FISCHER et al. 2013). Trotz der Möglichkeit einer adäquaten antikonvulsiven Therapie mit einer Vielzahl von verschiedenen AE kann sowohl in der Veterinär- als auch in der Humanmedizin bei über einem Drittel der Epilepsiepatienten keine zufriedenstellende Anfallsfreiheit gewährleistet werden (KWAN u. BRODIE 2000; KWAN u. SANDER 2004; LÖSCHER u. POTSCHKA 2005b; LÖSCHER u. SCHMIDT 2011). Eine vollständige Aufklärung der Mechanismen der Resistenzentwicklung bei Epilepsiepatienten war bislang allerdings noch nicht möglich. Es gibt mehrere Hypothesen zur Erklärung des Phänomens der Pharmakoresistenz. Die Transporter-Hypothese geht davon aus, dass eine vermehrte Expression spezieller Transportsysteme (ABC-Transporter) an der BHS zu einer eingeschränkten pharmakologischen Konzentration der AE im Gehirn führt (POTSCHKA 2010b). Die Ursachen der Überexpression der ABC-Transporter an der BHS werden noch diskutiert (LÖSCHER u. POTSCHKA 2005a). Wie in einigen Übersichtsarbeiten beschrieben, hat vor allem die Anfallsaktivität einen bedeutenden Einfluss auf eine vermehrte Expression der ABC-Transporter im epileptischen Gehirn (LÖSCHER u. POTSCHKA 2005b; REMY u. BECK 2006; POTSCHKA 2010a). Zudem wird auch eine Induktion der ABC-Transporter-Expression durch eine Applikation von AE diskutiert (WEN et al. 2008; WANG et al. 2010). Der Transporter-Hypothese kommt in der Praxis eine besondere Bedeutung zu, da im Falle einer funktionellen Relevanz der ABC-Transporter eine therapeutische Behandlung mit AE zur Entwicklung einer pharmakoresistenten Epilepsie beitragen könnte. Im Rahmen meiner Dissertation wurde die Regulation der ABC-Transporter Pgp, BCRP und MRP2 an isolierten Gehirnapillaren von Schweinen unter Einfluss der AE PB, CBZ und TPM in therapeutisch relevanten Konzentrationen geprüft. Zur Beurteilung der Regulation wurde die Transportaktivität der drei Transporter mittels Transport-Assay sowie die Proteinexpression von Pgp und BCRP mittels Western Blot untersucht. Diese Studie soll zum einen eine klinische Relevanz des Einflusses von AE in therapeutisch wirksamen Plasmakonzentrationen auf Pgp, BCRP und MRP2 überprüfen und zum anderen zu einem besseren Verständnis über die Pharmakokinetik von AE und anderen ZNS-Therapeutika beitragen.

Regulation der ABC-Transporter durch die AE PB, CBZ und TPM

PGP

Für den Transporter Pgp konnte festgestellt werden, dass die Exposition von isolierten porcinen Gehirnkapillaren mit PB und CBZ die Transportaktivität von Pgp nach drei und fünf Stunden signifikant erhöht. Die Pgp-Expression war hingegen infolge einer dreistündigen Exposition mit PB nicht verändert. Sie zeigte nach einer dreistündigen Inkubation mit CBZ eine signifikant verringerte Proteinexpression.

Eine mögliche Erklärung der divergenten Transportaktivität und –Proteinexpression von Pgp nach dreistündiger Exposition mit den AE ist der Mechanismus des intrazellulären Protein-Traffickings. Pgp befindet sich, neben seiner Lokalisation an der Plasmamembran, auch in intrazellulären Kompartimenten wie dem endoplasmatischen Retikulum, dem Golgi-Apparat, den Endosomen sowie den Lysosomen. Die Zelle kann den Transporter Pgp aus intrazellulären Reservoirs zur Zelloberfläche transportieren. Man geht davon aus, dass Pgp nicht permanent neu synthetisiert, sondern in Vesikeln zwischengelagert wird. Von dort kann der Transport von Pgp zur Plasmamembran erfolgen, wo es aktiv am Effluxtransport von Substanzen beteiligt ist (FU u. ARIAS 2012; MCCAFFREY et al. 2012). Dies stellt einen effektiven Weg dar, die Zelle vor potentiellen toxischen Stoffen zu schützen, da Pgp sehr schnell an seinen Wirkungsort gelangt ohne neu synthetisiert werden zu müssen (MAITRA et al. 2001; NOACK et al. 2014). Wenn Substanzen nur eine kurze Zeit verabreicht werden, kann sich durch den Prozess des Traffickings der Efflux-Transport von Pgp verändern, ohne einen Einfluss auf die zelluläre Gesamtproteinexpression von Pgp zu haben. Die vorliegende Studie könnte somit durch die schnelle Bereitstellung von Pgp auf einen kurzfristigen Anpassungsmechanismus hinweisen. Dies äußert sich in einer erhöhten Transportaktivität von Pgp. In diesem Kontext wäre es durchaus interessant, den Effekt der AE PB und CBZ auf die Bereitstellung des funktionellen Pgp's an der Plasmamembran durch Pgp-Trafficking zu untersuchen. Es wird diskutiert, dass eine Intervention in die Bereitstellung funktionellen Pgp's eine Verbesserung der Wirkstoffaufnahme ins Gehirn zur Folge hätte (DAVIS et al. 2014). Einige Vertreter der Familie der kleinen GTP-asen sind an der Regulation des Protein-Traffickings involviert (NOVICK u. ZERIAL 1997; SOMSEL RODMAN u. WANDINGER-NESS 2000; VAN DAM u. ROBINSON 2006). Es konnte bereits gezeigt werden, dass die kleinen GTP-asen RAB5A und *ras-related protein Ral-A* (RALA) das Pgp-Trafficking zwischen Plasmamembran und intrazellulären Kompartimenten regulieren können. Eine Ko-Transfektion von HeLa-Zellen mit den beiden GTP-asen führte zu einem Anstieg des intrazellulären Pgp's, woraufhin es zur intrazellulären Anreicherung von Daunorubicin kam. Fu et al. (2007) schlos-

sen aus diesen Beobachtungen, dass durch Kontrolle der Lokalisation von Pgp an der Plasmamembran eine Multidrug-Resistenz überwunden werden könnte (FU et al. 2007). Im Hinblick auf die Entwicklung therapeutischer Strategien zur Behandlung pharmakoresistenter Epilepsien ist allerdings zu berücksichtigen, dass RAB5A und RALA vielseitige Funktionen im Körper erfüllen, die darüber hinaus andere zelluläre Vorgänge im Körper modulieren können. Hinzu kommt, dass ein Eingriff in die Bereitstellung des funktionellen Pgp's an der Plasmamembran die protektive Funktion des ABC-Transporters außer Kraft setzen könnte. Dadurch kann es z. B. zur Anreicherung schädlicher Substanzen im Gehirn kommen.

In der vorliegenden Studie konnte nach dreistündiger Exposition mit CBZ eine verringerte Proteinexpression festgestellt werden. Dies legt die Vermutung nahe, dass der Auslöser einer verringerten Proteinexpression eine intrazelluläre Proteindegradation im Proteosom sein könnte (COOPER 2000). Ein weiterer Grund könnten posttranslationale Proteinmodifikationen sein, die zu einer Veränderung von Proteinen führen. Dadurch können posttranslationale Proteinmodifikationen einen Einfluss auf die Proteinexpression haben. Außerdem muss berücksichtigt werden, dass die Funktion von Pgp durch Phosphorylierung moduliert werden kann sowie von der Membranfluidität abhängt (BATES et al. 1992; SHAROM 2014). Die zugrundeliegende Ursache sollte allerdings noch eingehender untersucht werden.

Eine Exposition von isolierten porcinen Gehirnapillaren mit TPM führte in unserer Studie zu einer signifikant verringerten Transportaktivität nach einer Stunde. Die verringerte Transportaktivität von Pgp nach einer Stunde könnte zudem ein Effekt des Protein-Traffickings sein. Wie die schnelle Bereitstellung von Pgp an der Plasmamembran aus intrazellulären Vesikeln kann der Transporter auch wieder in die intrazellulären Kompartimente umverteilt werden. Dies hat einen reduzierten Efflux-Transport von Pgp zur Folge (NOACK et al. 2014). Die verringerte Transportaktivität von Pgp nach einer Stunde scheint allerdings für die Beurteilung einer funktionellen Bedeutung der Pgp-Regulation eine untergeordnete Rolle zu spielen, da eine verringerte Transportaktivität bereits nach drei und fünf Stunden nicht mehr nachweisbar ist.

Die vorliegende Studie untersuchte den unmittelbaren Effekt der AE auf die Regulation der ABC-Transporter. Darüber hinaus ist die Wirkung einer dauerhaften Applikation der AE PB, CBZ und TPM auf die ABC-Transporter aus klinischer Sicht besonders interessant. In tierexperimentellen Studien an Ratten hatte eine Applikation von PB, CBZ und PHT über ein bis zwei Wochen keinen Einfluss auf die Pgp-Expression in Gehirnapillaren (RIZZI et al. 2002; SEEGERs et al. 2002b). Eine dreiwöchige Verabreichung dieser AE führte jedoch zu einer erhöhten Pgp-Transportaktivität sowie -Expression (WEN et al. 2008). Auch in vitro konnte

an Rattenendothelzellen eine erhöhte Transportaktivität und Proteinexpression von Pgp nach einer 60-tägigen Behandlung mit den AE PB, CBZ, PHT und VPA nachgewiesen werden. Eine In-vitro-Studie an den zerebralen Rattenendothelzelllinien GPNT und RBE4 und der immortalisierten mikrovaskulären humanen zerebralen Endothelzelllinie hCMEC/D3 konnte keine klinisch relevante Induktion von Pgp durch eine dreitägige Exposition mit den AE PB, CBZ, TPM, LEV, PHT und VPA feststellen. Nur CBZ zeigte in der hCMEC/D3- Zellenlinie einen signifikanten Anstieg der Pgp-Transportaktivität (ALMS et al. 2014). Demgegenüber hat eine Studie von Lombardo et al. (2008) eine erhöhte Expression von Pgp nach dreitägiger Exposition mit PB und CBZ an immortalisierten kultivierten mikrovaskulären Endothelzelllinien aus dem Rattengehirn festgestellt. Für TPM konnte dies jedoch nicht gezeigt werden (LOMBARDO et al. 2008). Die verwendeten Konzentrationen von PB, CBZ und TPM waren allerdings höher als die in unserer Studie verwendeten therapeutischen Plasmakonzentrationen. Darüber hinaus kann keine Aussage über die Transportaktivität von Pgp in der Studie von Lombardo et al. (2008) getroffen werden, da die Proteinexpression nicht zwangsläufig mit der Transportaktivität von Pgp korreliert. Alms et al. (2014) führten die gegensätzlichen Ergebnisse ihrer Studie und die einheitliche Erhöhung der Expression von Pgp in den Experimenten von Lombardo et al. (2008) auf das Lösungsmittel DMSO zurück. Sie konnten eine erhöhte Expression von Pgp durch eine lang andauernde Exposition mit dem Lösungsmittel DMSO feststellen. Eine kurzzeitige Exposition mit DMSO hatte allerdings keine Auswirkung auf die Expression von Pgp (AMBROZIAK et al. 2010). Zusammen mit den Ergebnissen bisheriger Studien weist die vorliegende Arbeit darauf hin, dass die erhöhte Transportaktivität von Pgp an der BHS durch kurzzeitige Exposition mit PB und CBZ auf Trafficking-Vorgänge zurückzuführen ist und sich der Expressionslevel von Pgp wahrscheinlich erst nach wochenlanger Applikation der AE PB und CBZ ändert.

In diversen Studien ließ sich ein erhöhter Expressionslevel von Pgp im Gehirn von Patienten mit pharmakoresistenter Epilepsie nachweisen (TISHLER et al. 1995; DOMBROWSKI et al. 2001; SISODIYA et al. 2002; ARONICA et al. 2004; LAZAROWSKI et al. 2004; KUBOTA et al. 2006; AK et al. 2007). Interessant in diesem Kontext ist, ob eine Überexpression von Pgp zur Entwicklung einer pharmakoresistenten Epilepsie beitragen kann. Entscheidend ist deshalb die Frage nach der funktionellen Relevanz einer Überexpression von Pgp an der BHS. Dabei müssen mehrere Punkte berücksichtigt werden. Ein wichtiger Aspekt zur Beurteilung der funktionellen Relevanz ist, welche AE Substrate von Pgp darstellen (POTSCHKA 2010c). Die Substrateigenschaften von AE werden kontrovers diskutiert, da die Ergebnisse verschiedener In-vivo- und In-vitro-Studien teilweise widersprüchliche Resultate lieferten. Für Pgp

kann allerdings davon ausgegangen werden, dass eine Vielzahl von AE Substrate des Transporters darstellen (POTSCHKA u. LOSCHER 2001; POTSCHKA et al. 2002; RIZZI et al. 2002; SILLS et al. 2002). Ein weiterer Punkt zur Beurteilung einer funktionellen Relevanz ist, ob die Pgp-Proteinexpression mit der Gehirngängigkeit und der Wirksamkeit von AE korreliert (POTSCHKA 2010c). Es konnte anhand von Nagermodellen festgestellt werden, dass eine vermehrte Expression von Pgp die Gehirngängigkeit von PB, CBZ und PHT limitiert (RIZZI et al. 2002; VAN VLIET et al. 2007b; WEN et al. 2008). Anhand einer In-vitro-Studie mit Gehirngewebe von Patienten mit pharmakoresistenter Epilepsie konnte eine verringerte BHS-Durchlässigkeit für das AE PHT festgestellt werden (CUCULLO et al. 2007). In diesem Zusammenhang von Interesse ist, dass Patienten mit einer Oxcarbazepin-resistenten Epilepsie eine negative Korrelation der mRNA-Expression von Pgp mit der Konzentration eines Metaboliten von CBZ besteht (MARCHI et al. 2005). Für die Beurteilung einer funktionellen Relevanz ist darüber hinaus entscheidend, ob der Zustand einer bestehenden Pharmakoresistenz durch eine Hemmung der Transporter-Funktion behoben werden kann. Durch Verwendung des selektiven Pgp-Modulators Tariquidar konnte in tierexperimentellen Versuchen mit Nagern die Wirksamkeit der AE teilweise wieder hergestellt werden (CLINCKERS et al. 2005; BRANDT et al. 2006; VAN VLIET et al. 2006).

Diese Beobachtungen weisen zusammen mit den Ergebnissen der vorliegenden Studie darauf hin, dass eine Verabreichung der AE PB und CBZ eine erhöhte Regulierung von Pgp verursacht. Dies könnte zu einem therapeutischen Versagen und somit zur Entstehung einer pharmakoresistenten Epilepsie beitragen.

BCRP

Der Transporter BCRP zeigte keine vermehrte Expression nach einer Exposition von isolierten porcinen Gehirnapillaren mit den AE PB, CBZ oder TPM. Die Inkubation mit CBZ hatte zu keinem Zeitpunkt einen Einfluss auf die Regulation von BCRP. Die Exposition von isolierten porcinen Gehirnapillaren mit PB für fünf Stunden sowie mit TPM für drei und fünf Stunden zeigte eine reduzierte Transportaktivität von BCRP. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die BCRP-Aktivität nach Inkubation mit Estradiol unmittelbar, jedoch die Proteinexpression erst nach sechs Stunden in vitro und nach 24 Stunden in vivo reduziert war (HARTZ et al. 2010a; HARTZ et al. 2010b). Die verringerte Transportaktivität infolge einer PB- und TPM-Verabreichung könnte durch die Aufnahme des Transporters in intrazelluläre Vesikel bedingt sein. Möglicherweise verändert sich die Proteinexpression von BCRP nach Exposition mit PB und TPM erst verspätet durch eine gesteigerte intrazelluläre Proteindegra-

dation und/oder durch eine reduzierte De-novo-Synthese. Weitere Untersuchungen zur Bestimmung des Expressionslevels von BCRP nach fünf- oder sechsständiger Exposition mit PB und TPM könnten Aufschluss darüber geben. In der Vergangenheit wurden Faktoren beschrieben, die eine unterschiedliche Regulation der Transporter BCRP und Pgp bewirken. In eine Studie unserer Arbeitsgruppe an isolierten porcinen und humanen Gehirnkapillaren wurde kürzlich festgestellt, dass die Bindung von Glutamat an den NMDA-Rezeptor den gleichen Signalweg aktiviert, der den Transporter Pgp herauf-, aber BCRP herunterreguliert (SALVAMOSER et al. 2015). Darüber hinaus wurde das inflammatorische Zytokin $\text{TNF}\alpha$ als ein Faktor beschrieben, der eine Heraufregulierung von Pgp induziert, aber keine Regulierung für BCRP zur Folge hat (PODELL et al. 1995; VON WEDEL-PARLOW et al. 2009). Die Transporter Pgp und BCRP weisen eine große Überlappung ihres Substratspektrums auf. Außerdem ist die Proteinexpression von Pgp und BCRP an der BHS voneinander abhängig. Es konnte festgestellt werden, dass das Fehlen von Pgp an der BHS eine vermehrte Proteinexpression von BCRP zur Folge hat (CISTERNINO et al. 2004; AGARWAL et al. 2011). Daher sind die Regulationsmechanismen beider Transporter hinsichtlich ihres Zusammenspiels an der BHS von besonderer Relevanz. Die vorliegende Studie könnte auf eine Interaktion der beiden Transporter an der BHS sowie auf Kompensationsmechanismen des Transporters BCRP aufgrund der erhöhten Transportaktivität von Pgp hinweisen. Ihre Regulation könnte einen wesentlichen Einfluss auf die Wirksamkeit einer therapeutischen Behandlung verschiedener ZNS-Erkrankungen sowie auf die Exposition des Gehirns mit neurotoxischen Substanzen haben.

Der Transporter BCRP zeigt im humanen Gehirn im Vergleich zu Pgp deutlich höhere Expressionsraten (UCHIDA et al. 2011), weshalb die Frage, ob BCRP auch funktionell zur Entwicklung einer pharmakoresistenten Epilepsie beitragen könnte, umso wichtiger erscheint. Verschiedene Studien weisen darauf hin, dass die meisten AE vermutlich keine Substrate von BCRP darstellen (CERVENY et al. 2006; NAKANISHI et al. 2013; ROMERMANN et al. 2015). Allerdings konnte an MDCKII-Zelllinien festgestellt werden, dass das AE LTG von humanem und murinem BCRP transportiert wird und somit ein Substrat von BCRP darstellt (ROMERMANN et al. 2015). Der Transporter BCRP scheint daher, abgesehen von LTG, keinen großen Einfluss auf den Transport von AE zu nehmen. Die Regulation von BCRP durch PB und TPM hat daher eine begrenzte Auswirkung auf das Ansprechen einer Therapie mit AE. Dennoch ist die Regulation von BCRP grundsätzlich von Interesse, da eine permanente Herunterregulierung von BCRP möglicherweise die Penetration verschiedener pharmakologischer Wirkstoffe und Xenobiotika begünstigt und dadurch die Gefahr einer Neurotoxi-

zität steigern könnte. Da einige Zytostatika Substrate von BCRP darstellen, könnte eine Herunterregulierung von BCRP auch die Effektivität einer Tumorthherapie verbessern (LÖSCHER u. POTSCHKA 2005c; SALVAMOSER et al. 2015).

Die vorliegende Studie gibt einen Einblick in die unmittelbare Regulation des ABC-Transporters BCRP nach Exposition der AE PB, CBZ und TPM. Zusätzlich sollten die regulatorischen Auswirkungen von BCRP an der BHS nach einer Langzeit-Applikation von AE Gegenstand künftiger In-vitro- und In-vivo-Studien sein.

MRP2

Der ABC-Transporter MRP2 zeigte nach Inkubation von isolierten porcinen Gehirnkapillaren mit PB und CBZ zu jedem Zeitpunkt eine signifikant erhöhte Transportaktivität. Eine Exposition mit TPM führte hingegen zu einer erhöhten Transportaktivität nach einer Stunde sowie zu einer verringerten Transportaktivität nach drei und fünf Stunden. Dies deutet nach ein-, drei und fünfstündiger Exposition mit allen drei AE auf zelluläre Anpassungsreaktionen bezüglich der Bereitstellung von MRP2 an der Plasmamembran hin. Die Ergebnisse der Proteinexpression von MRP2 nach dreistündiger Inkubation mit den AE liegen bislang noch nicht vor. Falls beispielsweise im Rahmen unserer Studie eine vermehrte Expression von MRP2 nach dreistündiger Inkubation mit PB und CBZ nachzuweisen ist, könnte dies auf eine Induktion durch PB und CBZ hinweisen. Im Gegensatz dazu würde eine gleichbleibende Proteinexpression nach Exposition mit PB, CBZ und TPM auf intrazelluläre Trafficking-Prozesse hinweisen. Eine In-vitro-Studie an GPNT- und RBE4-Zelllinien konnte eine erhöhte Proteinexpression von MRP2 durch eine dreitägige Exposition mit PB, CBZ und PHT nachweisen. TPM hingegen führte zu keiner Induktion von MRP2 (LOMBARDO et al. 2008). Dies weist darauf hin, dass PB und CBZ möglicherweise einen Einfluss auf die Expression von MRP2 haben. Allerdings müssen die Transportaktivität und die Expression von Efflux-Transportern nicht zwangsläufig miteinander korrelieren. Eine Beurteilung über einen potentiellen Beitrag von MRP2 hinsichtlich einer verringerten Xenobiotika- oder Wirkstoffaufnahme ist anhand der Studie von Lombardo et al. (2008) nicht möglich. Unsere Studie weist zwar auf eine erhöhte Transportaktivität nach unmittelbarer Exposition hin, kann aber keine Aussage über die Transportaktivität nach drei Tagen treffen, da dies nicht untersucht wurde. Um die Ergebnisse differenziert beurteilen zu können, müssten im Rahmen unserer Studie die noch ausstehenden Ergebnisse der Proteinexpression von MRP2 miteinbezogen werden.

Der funktionelle Einfluss von MRP2 auf das Ansprechen einer medikamentellen Behandlung ist von entscheidender Bedeutung. Der Transporter MRP2 scheint keinen großen Einfluss auf

den Transport von AE zu nehmen (LUNA-TORTOS et al. 2009; LUNA-TORTOS et al. 2010). Die Regulation von MRP2 durch die AE PB, CBZ und TPM haben daher begrenzte Auswirkungen auf das Ansprechen einer Therapie mit AE. Dennoch ist die Regulation von MRP2 im Allgemeinen von Interesse. Eine dauerhafte Heraufregulierung von MRP2 durch AE könnte den Übertritt einiger endogener und schädlicher Stoffe sowie einiger zytostatischer Wirkstoffe, die MRP2-Substrate darstellen (z. B. Doxorubicin, Cisplatin, Epirubicin und Etoposide), vom Blutkreislauf ins Gehirn erschweren (LÖSCHER u. POTSCHKA 2005c; LUNA-MUNGUIA et al. 2015). Meines Wissens sind die regulatorischen Auswirkungen von MRP2 nach einer Langzeit-Applikation von AE noch nicht untersucht worden. Dies sollte in künftigen In-vivo-Studien untersucht werden, da so eine Aussage über eine potentielle Korrelation zwischen einer vermehrten Expression von MRP2 und einem therapeutischen Versagen einiger Wirkstoffe getroffen werden kann.

Potentielle Regulation der ABC-Transporter über die Kernrezeptoren CAR/PXR

Verschiedene intrazelluläre Signalwege sind an der Regulation von ABC-Transportern beteiligt. Dabei kommt dem Mechanismus der Kernrezeptor-vermittelten ABC-Transporter-Regulation eine große Bedeutung zu (MILLER 2010). Kernrezeptoren sind durch ihren Einfluss auf metabolisierende Enzyme und ABC-Transporter der Leber, Nieren und dem Darm für die Kontrolle der Körperabwehr, der Elimination verschiedener endogener und exogener Stoffe und des exkretorischen Systems zuständig (KLIEWER et al. 2002). Auch die Kernrezeptoren *constitutive androstane receptor* (CAR) und *pregnane-X-receptor* (PXR) sind an der BHS von Mäusen, Ratten, Schweinen und Menschen exprimiert (BAUER et al. 2004; DAUCHY et al. 2008; OTT et al. 2009; NANNELLI et al. 2010).

Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Aktivierung der Kernrezeptoren CAR und PXR durch Liganden wie Xenobiotika oder pharmakologische Wirkstoffe die Expression von ABC-Transportern an der BHS reguliert (HARTZ u. BAUER 2010). Verschiedene Ex-vivo- und In-vivo-Studien zeigten eine transkriptionale Heraufregulierung von Pgp, BCRP und MRP2 an der BHS durch PXR-Liganden (BAUER et al. 2004; BAUER et al. 2006; BAUER et al. 2008a). In einer Studie von Wang et al. (2010) führte die Exposition mit PB, *pregnenolone 16 α -carbonitrile* (PCN) und *1,4-Bis[2-(3,5-dichloropyridyloxy)]benzene* (TCPOBOP) sowohl in vivo als auch in vitro zu einer erhöhten Expression und Transportaktivität der Transporter Pgp, BCRP und MRP2 (WANG et al. 2010). PB induzierte bereits nach einer Stunde die Pgp- und nach zwei Stunden die MRP2- und BCRP-Transportaktivität. Die für PB verwendete Konzentration von 1 mM ist fast sechsmal so hoch wie die therapeutische Plas-

makonzentration, die in der Humanmedizin verwendet wird. Dies könnte ein Grund für die unterschiedlichen Ergebnisse sein.

Translationale Aspekte

In der Beurteilung der Ergebnisse der Studie von Wang et al. (2010) und der zahlreichen In-vivo-Studien an Nagern und In-vitro-Studien an Endothelzelllinien sowie an isolierten Gehirnkapillaren von Nagern zur Kernrezeptor-vermittelten Regulation von Efflux-Transportern müssen die Speziesunterschiede hinsichtlich der Kernrezeptoren CAR und PXR berücksichtigt werden. Es konnte festgestellt werden, dass das Schwein in der Übereinstimmung der Aminosäure-Sequenzen der Kernrezeptoren CAR und PXR dem Menschen viel ähnlicher ist als beispielsweise die Maus oder die Ratte. Der Kernrezeptor CAR von Schweinen (pgCAR) ist in seiner Aminosäurestruktur mit einer Übereinstimmung von 87 % dem humanen CAR (hCAR) sehr ähnlich, wohingegen nur eine 73%ige Übereinstimmung zum CAR von Mäusen (mCAR) besteht (DI MASI et al. 2009). Ähnliche Ergebnisse zeigten sich im Vergleich von pgPXR, hPXR und mPXR. Es konnte eine 87%ige Sequenzübereinstimmung der Ligandenbindungsdomäne von pgPXR und hPXR festgestellt werden. Die Ähnlichkeiten der Ligandenbindungsdomäne bezüglich des mPXR zu hPXR ist wesentlich geringer (MOORE et al. 2002). Dies ist auch der Grund, weshalb humanspezifische CAR- und PXR-Liganden durch Aktivierung von pgPXR und pgCAR zu einer erhöhten ABC-Transporter-Expression und -Transportaktivität an Gehirnkapillaren von Schweinen führen (LEMMEN et al. 2013a; LEMMEN et al. 2013b).

Derzeit ist allerdings noch nicht bekannt, ob eine Kernrezeptor-vermittelte Transporterregulierung eine Rolle an der BHS des Menschen spielt und ob ein Eingriff in diesen Signalweg eine vielversprechende therapeutische Strategie darstellen könnte. Klinische Daten weisen jedoch darauf hin, dass Kernrezeptoren an der Regulation von ABC-Transportern der Leber, der Niere und des Darms involviert sind. Ob dies auch an der BHS des Menschen der Fall ist, bleibt in künftigen Studien zu klären (HARTZ u. BAUER 2010).

Ein weiterer Aspekt ist, dass frisch isolierte Gehirnkapillaren in ihrer Morphologie dem In-vivo-Zustand sehr ähnlich sind. Außerdem bleiben durch die Methodik der Kapillarisation die Tight Junctions unverändert (JOO 1985). Immortalisierte Zell-Linien wie RBE4-Zellen, CR3 Zellen oder PBMEC/C1-2 weisen in der Regel eine höhere Permeabilität als die BHS im In-vivo-Zustand auf. Außerdem hängt der Expressionslevel von Pgp von den Kulturbedingungen ab und ist generell schwächer als in frisch isolierten Gehirnkapillaren (LECHARDEUR et al. 1995; BEGLEY 1996; TEIFEL u. FRIEDL 1996; GARBERG 1998).

Daher ist die Verwendung von frisch isolierten Gehirnkapillaren für die Untersuchungen von Transportvorgängen der ABC-Transporter an der BHS besser geeignet als z. B. kultivierte Zelllinien. Das verwendete BHS-Modell mit frisch isolierten porcinen Gehirnkapillaren spiegelt zwar die Situation bei humanen Epilepsiepatienten nicht wider, kommt dieser aber sehr nahe.

Ausblick der Studie

1. Einige Studien konnten den CAR- und PXR-vermittelten Signalweg als zugrundeliegenden Mechanismus für eine Regulierung der ABC-Transporter an der BHS identifizieren (BAUER et al. 2006; BAUER et al. 2008a; LOMBARDO et al. 2008; WANG et al. 2010). Wang et al. (2010) brachte die Heraufregulierung der Transporter Pgp, BCRP und MRP2 in Verbindung mit einer Aktivierung des Kernrezeptors CAR durch das AE PB. Eine Vorbehandlung der isolierten Gehirnkapillaren mit dem spezifischen CAR-Modulator Okadaic acid verhinderte eine Induktion der Transportaktivität aller drei Transporter durch PB (WANG et al. 2010). Im Rahmen dieser Studie war keine erhöhte Proteinexpression von Pgp nachweisbar, weshalb die erhöhte Transportaktivität nicht auf eine Kernrezeptor-vermittelte Induktion, sondern eher auf Trafficking-Prozesse zurückzuführen ist.

Sollte anhand künftiger Studien jedoch eine erhöhte Proteinexpression von MRP2 festzustellen sein, wäre z. B. durch Verwendung der Kernrezeptormodulatoren Okadaic acid für CAR sowie Ketoconazol für PXR zu prüfen, ob die Heraufregulierung von MRP2 durch die Aktivierung von CAR und/oder PXR verursacht wird.

2. Im Rahmen dieser Studie wurde zur Bestimmung der Transportaktivität mittels Transport-Assay zusätzlich zu den AE das spezifische Fluoreszenzsubstrat der jeweiligen Transporter (NBD-CSA für Pgp, BODIPY-Prazosin für BCRP und Texas Red für MRP2) gegeben. Es ist zu berücksichtigen, dass sich zwei Transporter-Substrate im Sinne eines kompetitiven Antagonismus gegenseitig beeinflussen können. Deshalb ist zur Beurteilung der Transportaktivität dieser Studie von entscheidender Bedeutung, ob die AE PB, CBZ und TPM Substrate der Transporter Pgp, BCRP und MRP2 darstellen. Nach bisherigen Ergebnissen aus In-vitro-Experimenten, die durch die Methodik des *concentration equilibrium transport assays* (CETA's) erhoben wurden, konnte kein Transport der AE PB, CBZ und TPM durch MRP2 festgestellt werden (LUNA-TORTOS et al. 2009; LUNA-TORTOS et al. 2010). Dies wurde für CBZ anhand weiterer Versuche mit Zelllinien bestätigt (BALTES et al. 2007; RADISCH et al. 2014). Ähnlich verhält es sich mit dem Transport dieser AE durch BCRP. Erst kürzlich konnten Römermann et al. (2015) einen Transport der AE PB, CBZ und TPM mittels CETA's

durch den Transporter BCRP ausschließen. Sie bestätigten damit die durch den konventionellen bidirektionalen Transport-Assay erhobenen Daten für PB und CBZ (CERVENY et al. 2006; ROMERMANN et al. 2015). PB konnte sowohl in In-vitro- als auch in In-vivo-Versuchen als Substrat von Pgp identifiziert werden (POTSCHKA et al. 2002; WEISS et al. 2003; WEST u. MEALEY 2007; LUNA-TORTOS et al. 2008; YANG u. LIU 2008; ZHANG et al. 2010). Für die AE CBZ und TPM als mögliche Substrate von Pgp gibt es widersprüchliche Aussagen. In keiner der In-vitro-Experimente mit Zelllinien konnte CBZ als Substrat identifiziert werden (OWEN et al. 2001; MAHAR DOAN et al. 2002; WEISS et al. 2003; MAINES et al. 2005; CROWE u. TEOH 2006; BALTES et al. 2007; WEST u. MEALEY 2007; LUNA-TORTOS et al. 2008; ZHANG et al. 2011). Allerdings wurde CBZ sowohl in Studien mit Nagern als auch anhand einer Studie an chirurgisch entferntem Gewebe von Patienten mit pharmakoresistenter Epilepsie als Substrat von Pgp nachgewiesen (POTSCHKA et al. 2001; RIZZI et al. 2002; RAMBECK et al. 2006). Eine aktuellere In-vivo-Studie von 2013 mit Mäusen konnte dies nicht bestätigen (NAKANISHI et al. 2013). Auch für das AE TPM existieren widersprüchliche Daten aus tierexperimentellen Studien und Experimenten mit Zelllinien (SILLS et al. 2002; CROWE u. TEOH 2006; WEST u. MEALEY 2007; LUNA-TORTOS et al. 2008; NAKANISHI et al. 2013). Demnach kann keine eindeutige Aussage über die Substrateigenschaften von TPM und CBZ bezüglich des Transporters Pgp getroffen werden.

Zusammenfassend lässt sich hinsichtlich der Transportaktivitätsversuche dieser Studie sagen, dass möglicherweise der Transporter Pgp durch gleichzeitige Inkubation von PB mit dem spezifischen Fluoreszenzsubstrat NBD-CSA und eventuell auch von CBZ bzw. TPM mit NBD-CSA kompetitiv gehemmt wurde. Dies könnte sich in einer verringerten Transportaktivität von Pgp äußern. Allerdings war der Expressionslevel von Pgp nach Exposition mit den AE nicht erhöht. Deshalb kann davon ausgegangen werden, dass die Transportaktivitätsversuche einen potentiell erhöhten Kernrezeptor-vermittelten Expressionslevel von Pgp nicht verschleiern. Eine erhöhte Transportaktivität von Pgp könnte im Rahmen dieser Studie nach Inkubation der AE PB und CBZ auf verstärkte Trafficking-Prozesse nach drei und fünf Stunden bzw. auf Trafficking-Vorgänge bereits nach einer Stunde hindeuten. Nach Exposition mit TPM weist eine höhere Transportaktivität von Pgp nach drei und fünf Stunden möglicherweise auf Trafficking-Prozesse sowie auf keine signifikante Veränderung der Transportaktivität nach einer Stunde hin. Diese Vermutungen sind allerdings höchst spekulativ und sollten durch Anpassung der Transportaktivitätsversuche für Pgp mittels Transport-Assay überprüft werden.

2. **Modulation Blut-Hirn-Schranken-assoziiertes *pathways* und Proteine während der Epileptogenese**

Im Vergleich zur pharmakologischen Strategie, epileptische Anfälle zu unterdrücken, wäre es von größerem klinischem Nutzen, in den Prozess der Epilepsieentstehung präventiv einzugreifen. Die Identifikation geeigneter Biomarker sowie Zielstrukturen bilden die Basis für die frühzeitige Erkennung und Prävention einer Epilepsieentstehung. Die dafür notwendigen Kenntnisse der zugrundeliegenden pathophysiologischen Mechanismen der Epileptogenese sind allerdings noch weitgehend unbekannt (HOLTKAMP u. MEIERKORD 2007). Bisherige Studien bringen unter anderem eine Störung der BHS sowie eine vermehrte Angiogenese in Verbindung mit epileptischen Anfällen sowie der Entstehung von Epilepsien (SEIFFERT et al. 2004; PAVLOVSKY et al. 2005; OBY u. JANIGRO 2006; IVENS et al. 2007; MARCHI et al. 2007; RIGAU et al. 2007; TOMKINS et al. 2007; VAN VLIET et al. 2007a; TOMKINS et al. 2008; DALVI et al. 2014). Ein Eingriff in angiogenetische Prozesse während der Epileptogenese könnte beispielsweise eine wirksame Möglichkeit sein, in die Entstehung einer Epilepsie einzugreifen sowie die Anzahl epileptischer Anfälle zu reduzieren (MORIN-BRUREAU et al. 2011). Vor diesem Hintergrund wurden in der vorliegenden Studie Signalwege und Proteine der BHS untersucht, die in Zusammenhang mit der Epileptogenese stehen könnten. Ziel ist es, potentielle Biomarker und Zielmoleküle zu identifizieren, die eine Vorhersage einer Epilepsieentstehung ermöglichen sowie die Entwicklung antiepileptogener Therapien vorantreiben könnten. Des Weiteren soll diese Studie zu einem besseren Verständnis der pathophysiologischen Mechanismen an der BHS während der Epileptogenese beitragen.

Regulation Wachstumsfaktoren-assoziiertes *pathways*

Typische Induktoren der Angiogenese sind Wachstumsfaktoren wie z. B. Vertreter der VEGF- und der EGF-Familie (OTROCK et al. 2007). Bisherige Studien zur Erforschung angiogenetischer Prozesse im epileptogenen Gehirn bzw. während der Epileptogenese beschäftigten sich hauptsächlich mit dem HC (RIGAU et al. 2007; NDODE-EKANE et al. 2010; MORIN-BRUREAU et al. 2011). In einem Tiermodell der TLE konnte bereits ein Zusammenhang zwischen der Angiogenese und einer erhöhten Permeabilität der BHS im HC während der Epileptogenese festgestellt werden (RIGAU et al. 2007). In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass Wachstumsfaktoren-assoziiertes *pathways* im HC und im PHC vermehrt reguliert sind. Dabei sind im PHC vor allem in der Latenzphase mehr *pathways* reguliert als im HC. Im Rahmen der Dissertation von Andreas Walker konnte bereits festgestellt

werden, dass im PHC zu jedem Zeitpunkt mehr differentiell exprimierte Proteine identifiziert wurden als im HC (WALKER 2016). Dies könnte die Ursache für die größere Anzahl der Wachstumsfaktoren-assoziierten regulierten *pathways* im PHC sein.

An reseziertem epileptischen humanen Gewebe von TLE-Patienten sowie in einem Tiermodell der TLE konnte gezeigt werden, dass angiogenetische Prozesse durch eine vermehrte Regulation von VEGF in Neuronen und VEGFR-2 in Endothelzellen vermittelt werden (RIGAU et al. 2007). In diesem Kontext war im PHC in der Latenzphase der *pathway VEGFR3 signaling in lymphatic endothelium* reguliert. VEGFR3 wird vorwiegend in sich entwickelten lymphatischen Gefäßen exprimiert und erfüllt eine Funktion in der Lymphangiogenese (KAIPAINEN et al. 1995). Es konnte zudem festgestellt werden, dass VEGFR3 in hohem Maße in aussprossenden angiogenetischen Endothelzellen (sog. *tip cells*) exprimiert ist und eine entscheidende Funktion in der Angiogenese einnimmt (TAMMELA et al. 2008). Erst kürzlich konnten Loaveau et al. (2015) feststellen, dass Lymphgefäße, anders als früher angenommen, auch im ZNS an der Dura mater zu finden sind (LOUVEAU et al. 2015). Die vorliegende Studie könnte daher möglicherweise auf eine vermehrte Lymphangiogenese, aber auch auf eine gesteigerte Angiogenese in der Latenzphase der Epileptogenese hinweisen. Die VEGFR3-Signalkaskade könnte demnach ein wichtiges regulatorisches System in angiogenetischen Prozessen darstellen und möglicherweise als neues Target in antiangiogenetischen Therapien fungieren.

Darüber hinaus konnte eine Regulierung von *pathways* nachgewiesen werden, die regulierend auf VEGF-induzierten Signalkaskaden einwirken. Der *pathway Paxillin* war im HC während der Latenzphase reguliert. Außerdem wurde im HC in der chronischen Phase sowie im PHC in der frühen Post-Insult-Phase eine Regulation der *pathways Paxillin* und *Caveolin 1* nachgewiesen. Der *pathway Caveolin 1* zeigte zudem eine Regulierung in der Latenzphase im PHC. *Paxillin* zählt zu den fokalen Adhäsionsproteinen und ist essentiell für eine VEGF-A-vermittelte Angiogenese in Endothelzellen (YANG et al. 2015). Meines Wissens ist diese Studie die erste, die das Protein *Paxillin* mit der Entstehung von Epilepsien assoziiert. Das Protein *Caveolin 1* bildet das Gerüst von *Caveolae*. Sie stellen kleine Invaginationen der Plasmamembran dar und sind involviert in essentielle zelluläre Funktionen wie die Signaltransduktion, den Lipidmetabolismus, die zelluläre Kontrolle des Wachstums und der Apoptose (PARTON 1996; COUET et al. 1997). *Caveolin 1* interagiert mit verschiedenen Signalmolekülen und wirkt an der Regulierung der Signalmoleküle mit. *Caveolin-1* stellt einen negativen Regulator der Signaltransduktion dar. Eine Herunterregulierung von *Caveolin-1* könnte wichtig für die Zellproliferation und die nachfolgende Angiogenese sein (SCHERER

et al. 1995; LIU et al. 1999). Zudem wird vermutet, dass molekulare Veränderungen einer dysfunktionalen BHS infolge vermehrter *Caveolae* auftreten. Dies führt zum Durchtritt von Proteinen des Blutes in das Gehirn und zur Bildung von vaskulären Ödemen (NAG et al. 2007; NAG et al. 2009). Infolgedessen kann es zu einer verringerter Expression von Tight-Junction-Proteinen kommen (YEUNG et al. 2008). Durch die Hemmung der Caveolin-1-Signalkaskade könnte möglicherweise eine erhöhte Durchlässigkeit der BHS verhindert werden. Darüber hinaus könnten der *Paxillin*- und der *Caveolin 1*-Signalweg ein potentielles Target der Epileptogenese zur Unterdrückung der VEGF-vermittelten Angiogenese darstellen. Allerdings sind zur Abklärung ihrer Relevanz in der Epileptogenese noch weitere Studien notwendig.

Neben VEGF-assoziierten Signalwegen konnten außerdem im PHC regulierte EGF-vermittelte *pathways* identifiziert werden. EGF ist beteiligt an der Regulation der Zellproliferation und -differenzierung (HERBST 2004). Es konnte bereits festgestellt werden, dass epileptische Anfälle zu einer Vermehrung verschiedener Vertreter der EGF-Familie sowie deren ERBB (bzw. EGFR)-Rezeptoren führen (SCHARFMAN 2005). Die Regulierung der EGF-assoziierten *pathways* deutet auf eine vermehrte Zellproliferation und -differenzierung in der Post-Insult- sowie in der Latenzphase der Epileptogenese im PHC hin. Zudem ist EGF in angiogenetische Prozesse involviert und besitzt angiogenetische Eigenschaften (OTROCK et al. 2007). Deshalb könnte die vorliegende Studie zudem auf eine potentielle Beteiligung von EGF in angiogenetische Prozesse im Verlauf der Epileptogenese hinweisen. Allerdings sollte die Rolle des Faktors EGF hinsichtlich seiner angiogenetischen Funktion während der Epileptogenese noch weiter untersucht werden.

Darüber hinaus muss bezüglich antiangiogenetischer Strategien berücksichtigt werden, dass die schnelle Sekretion von Wachstumsfaktoren nach epileptischen Anfällen nicht nur eine Wirkung auf die erhöhte Permeabilität der BHS hat, sondern gleichzeitig einen schützenden Mechanismus darstellt (MCCLOSKEY et al. 2005; LEE et al. 2006; HOLMES et al. 2007; NICOLETTI et al. 2008; MARCHI u. LERNER-NATOLI 2013). Es konnte in vitro und in vivo festgestellt werden, dass die Sekretion von VEGF eine antiepileptogene und eine neuroprotektive Wirkung hat (MCCLOSKEY et al. 2005). Einige VEGF-Signalwege sind an der Funktion und am Überleben von Neuronen beteiligt (MCCLOSKEY et al. 2005; LEE et al. 2006; HOLMES u. ZACHARY 2008; NICOLETTI et al. 2008). So aktiviert VEGF über den VEGFR2/AKT-Signalweg die eNO-Freisetzung, woraufhin die Vasodilatation durch Stimulation der löslichen Guanylatcyclase durch Stickstoffmonoxid (NO) gefördert wird (AHMAD et al. 2006). Eine Hemmung des VEGFR2/AKT-Signalweges z. B. durch einen AKT-Inhibitor

erhöht die Neurotoxizität, da der VEGFR2/AKT-Signalweg zum Schutz der Neuronen beiträgt (MORIN-BRUREAU et al. 2012). In der vorliegenden Studie konnte im PHC in der Post-Insult-Phase der regulierte *pathway Nitric oxide stimulates guanylate cyclase* identifiziert werden. Das Enzym eNOS ist in Mikrogefäßen im epileptischen Fokus des Rattengehirns vermehrt exprimiert (LERNER-NATOLI et al. 1994). Es konnte in einem Kainat-induzierten SE-Modell gezeigt werden, dass eine Hemmung der NO-Synthese den neuronalen Schaden drastisch erhöht (RONDOUIN et al. 1993). Unsere Studie könnte auf einen neuroprotektiven Mechanismus durch Anpassung des Blutflusses nach einem epileptischen Insult hinweisen. Eine Stimulation des VEGFR2/AKT-Signalweges könnte möglicherweise nach einem Insult durch Schutz der Neuronen präventiv in den Prozess der Epileptieentstehung eingreifen.

Das Protein *vasoactive intestinal peptide* (VIP) hat eine Funktion im kardiovaskulären System. Im PHC wurde während der Latenzphase der regulierte *pathway vasoactive intestinal peptide* nachgewiesen. VIP wird unter anderem im peripheren und zentralen Nervensystem exprimiert (MAGISTRETTI et al. 1988; NUSSDORFER u. MALENDOWICZ 1998; GOZES et al. 1999). Dort fungiert es als nicht-adrenergischer und nicht-cholinergischer Neurotransmitter bzw. Neuromodulator (FAHRENKRUG 1989). VIP stellt einen um 50 bis 100-fach potenteren Vasodilatator als Acetylcholin dar. Im zentralen Nervensystem wirkt VIP z. B. an der Regulation des Blutflusses, des Energiemetabolismus und der Enzymaktivitäten mit (MAGISTRETTI et al. 1988; NUSSDORFER u. MALENDOWICZ 1998; GOZES et al. 1999). Zudem konnte festgestellt werden, dass VIP die Expression von VEGF fördert und somit ein proangiogenetisches Potential besitzt (COLLADO et al. 2004; VALDEHITA et al. 2007). Außerdem gibt es Hinweise darauf, dass VIP in die Epileptogenese involviert sein könnte (ZOU u. RUAN 2000). Der regulierte *pathway vasoactive intestinal peptide* könnte auf eine gesteigerte Regulation des kardiovaskulären Systems in der Latenzphase hindeuten und möglicherweise zur Förderung angiogenetischer Prozesse während der Epileptogenese beitragen. Es existieren bereits diagnostische Testsysteme, die den VIP-Gehalt im Blut nachweisen (VIP-Test). In künftigen Studien sollte die Rolle von VIP in der Epileptogenese näher abgeklärt werden, da VIP als Biomarker angiogenetischer Prozesse während der Epileptogenese zum Einsatz kommen könnte.

Generell ist darauf hinzuweisen, dass die erwähnten Wachstumsfaktoren selbst sowie *Paxillin*, *Caveolin-1* und VIP nicht identifiziert werden konnten. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass das Proteom der beiden Gewebe nur zu punktuellen Zeitpunkten untersucht wurde und eine differentielle Expression der Proteine so nicht erfasst werden konnte. Aus

diesem Grund sollten in zukünftigen Studien weitere Zeitpunkte während der Epileptogenese analysiert werden, wodurch die genannten Proteine möglicherweise erfasst werden können.

Expressionsmuster differentiell exprimierter Wachstumsfaktoren-assoziiierter Proteine

Die *Pathway*-Analyse ermöglichte die Identifikation Wachstumsfaktoren-assoziiierter Proteine, die in die Regulation von Wachstumsfaktoren, insbesondere von VEGF, involviert sind. Frühere Studien beschäftigten sich hinsichtlich angiogenetischer Prozesse im epileptischen Gehirn hauptsächlich mit dem Wachstumsfaktor VEGF (RIGAU et al. 2007; MORIN-BRUREAU et al. 2011; MORIN-BRUREAU et al. 2012; DALVI et al. 2014). Die vorliegende Studie liefert nun Informationen über Proteine im Zeitverlauf der Epileptogenese, die einen modulatorischen Einfluss auf VEGF haben könnten. Sie könnten möglicherweise als Biomarker sowie als Zielstrukturen antiepileptogener Behandlungsstrategien dienen.

Überaus interessant ist das Expressionsmuster der beiden Proteine NCL und Myh9. Das an der Endotheloberfläche exprimierte NCL stellt einen spezifischen Marker für angiogenetische Endothelzellen dar (CHRISTIAN et al. 2003). NCL zeigte eine Heraufregulierung während der Post-Insult-Phase und der Latenzphase sowohl im HC als auch im PHC. Während der Angiogenese ist die Heraufregulierung von NCL an der Oberfläche von Endothelzellen notwendig, um NCL vom Nukleus zur Endothelmembran zu befördern. Die Translokation von NCL wird durch den Wachstumsfaktor VEGF stimuliert. Damit NCL seine angiogenetische Funktion erfüllen kann, verankert MYH9 NCL im Zytoskelett der Endothelzellen (HUANG et al. 2006). MYH9 war in beiden Geweben während der Latenzphase vermehrt exprimiert. Die Heraufregulierung von NCL weist auf eine vermehrte Angiogenese in der Post-Insult- und der Latenzphase im PHC und im HC hin. Die angiogenetische Funktion kann NCL möglicherweise aber erst durch eine vermehrte Expression von MYH9 in der Latenzphase erfüllen. Darüber hinaus kann NCL die Anzahl von Wachstumsfaktoren, die eine angiogenetische Aktivität besitzen, erhöhen (KOUTSIOUMPA et al. 2012). Möglicherweise fördert NCL angiogenetische Prozesse bereits während der Post-Insult-Phase der Epileptogenese. Eine Blockade oder Herunterregulation von NCL, das an der Oberfläche von Endothelzellen exprimiert ist, hemmt die Migration von Endothelzellen und verhindert die kapilläre Tubulus-Formation (HUANG et al. 2006). Möglicherweise könnte NCL nicht nur als angiogenetischer Biomarker während der Epileptogenese fungieren, sondern auch durch den Einsatz von MYH9- oder NCL-Antikörpern eine antiangiogenetische Strategie während der Epileptogenese verfolgt werden. In weiteren tierexperimentellen Studien sollte getestet werden, ob der Einsatz solcher Antikörper einen antiangiogenetischen und möglicherweise einen antiepileptogenen Effekt

ausüben.

Die Immunhistochemie stellte im PHC und im HC das differentielle Expressionsmuster von NCL in der Latenzphase der Epileptogenese dar. Die immunhistochemische Färbung bestätigt die Proteomdaten und weist eine vermehrte Expression von NCL im HC und im PHC während der Latenzphase nach. Zudem konnte die zelluläre Verteilung von NCL nachgewiesen werden. Es zeigte sich eine nukleare Färbung von Neuronen und Zellen mit gliaähnlicher Morphologie. Darüber hinaus wies auch das Zytoplasma der gliaähnlichen Zellen eine positive Immunreaktion auf. Eine Anfärbung des Kerns von Neuronen und Gliazellen wie Astrozyten und Mikroglia konnte bereits in anderen Studien bestätigt werden (HUSSEMAN et al. 2000; XU et al. 2012). Zudem lässt die immunhistochemische Färbung von NCL die Vermutung zu, dass die Expression in Gefäßendothelzellen im HC und im PHC vermehrt ist. Dies könnte auf eine gesteigerte Angiogenese während der Latenzphase der Epileptogenese hinweisen (CHRISTIAN et al. 2003; HUANG et al. 2006; DING et al. 2012). Diese Vermutung muss quantitativ anhand weiterer immunhistochemischer Färbungen an einer ausreichend großen Tiergruppe während der Epileptogenese abgeklärt werden. Zusätzlich sollte über eine immunhistochemischen Doppelmarkierung (GLUT-1-Transporter) mit entsprechenden Markermolekülen eine Expression von NCL in Gefäßendothelzellen bestätigt werden. Erst dann kann eine abschließende Aussage getroffen werden.

ANXA1 und ANXA2 sind involviert in die VEGF-vermittelte Zellmigration (LING et al. 2004; COTE et al. 2010). Das Protein ANXA2 ist in beiden Geweben zu allen drei Zeitpunkten reguliert. ANXA2 fungiert als Rezeptor, der Plasminogen in Plasmin umwandelt. Es konnte festgestellt werden, dass ein Defizit an ANXA2 zu einem Verlust an Plasmin führt. Dies hemmt die Aktivierung der MMP-9 und der *matrix metalloproteinase 13* (MMP-13) und resultiert in einer gehemmten Zellmigration (LING et al. 2004). Die vermehrte Expression von ANXA2 könnte auf eine erhöhte Zellmigration während angiogenetischer Prozesse hinweisen. Da eine übermäßige Produktion von Plasmin zu einem Abbau der extrazellulären Matrix und der Basalmembran von Blutgefäßen führt, könnte die Heraufregulierung von ANXA2 auch auf das Vorhandensein einer dysfunktionalen BHS zu allen drei Zeitpunkten hindeuten (SHARMA u. SHARMA 2007). ANXA1 ist ein Schlüsselregulator in der physiologischen sowie pathologischen Angiogenese. In der Tumorforschung konnte gezeigt werden, dass eine vermehrte Expression von ANXA1 die Rekrutierung und Stabilisierung neuer Gefäße fördert (YI u. SCHNITZER 2009). In der vorliegenden Studie zeigte ANXA1 eine Heraufregulierung zehn Tage nach SE in beiden Geweben. Die gleichzeitige Heraufregulierung von ANXA1 und ANXA2 weist möglicherweise auf das Auftreten einer pathologischen Angioge-

nese während der Latenzphase der Epileptogenese hin. Außerdem regulieren ANXA1 und ANXA2 durch Hemmung der Phospholipase A2 die Phospholipaseaktivität A2 (LIU et al. 2007a). Dadurch vermitteln ANXA1 und ANXA2 einen hochpotenten antiinflammatorischen Effekt (LIU et al. 2004a; LIU et al. 2007a). Annexine könnten durch Hemmung der Phospholipase als endogene neuroprotektive Agenzien wirken. In diesem Kontext konnte festgestellt werden, dass im ZNS nach einem akuten Insult sowie bei chronischen Veränderungen des ZNS die Expression von ANXA1, ANXA2 und *annexin A4* (ANXA4) in reaktiven Astrozyten erhöht ist (EBERHARD et al. 1994). Aufgrund der vielfältigen Funktionen von ANXA1 und ANXA2 müsste in künftigen Studien untersucht werden, ob während der Epileptogenese den Proteinen ANXA1 und ANXA2 tatsächlich eine proangiogenetische Funktion zugesprochen werden kann.

Die proliferative Phase der Angiogenese ist unter anderem charakterisiert durch die Expression von Zelladhäsionsmolekülen (BROOKS 1996). Die Adhäsionsproteine MCAM und PPAP2B sind an der Zelladhäsion sowie an Zell-Zell-Interaktionen während der VEGF-vermittelten Angiogenese beteiligt (WARY u. HUMTSOE 2005; WANG u. YAN 2013). MCAM fungiert als endothelialer Biomarker während einer pathologischen Angiogenese. Außerdem stellt MCAM einen Ko-Rezeptor für VEGFR2 dar, wodurch der Krankheitsverlauf durch eine gesteigerte Angiogenese progressiv voranschreitet (WANG et al. 2013; WANG u. YAN 2013). Die Heraufregulierung von MCAM im PHC weist auf eine pathologische Angiogenese in der Post-Insult- und der Latenzphase der Epileptogenese hin. Für PPAP2B konnte im PHC ein erhöhter Expressionslevel zehn Tage nach SE nachgewiesen werden. Eine Studie zeigte eine Inhibition der FGF- und VEGF-induzierten kapillären Morphogenese durch Hemmung von PPAP2B mit einem polyklonalen anti-PPAP2B-Antikörper (WARY u. HUMTSOE 2005). Beide Proteine stellen vielversprechende potentiell antiangiogenetische Targets der Epileptogenese dar. Durch dessen Hemmung könnte möglicherweise in der frühen Post-Insult- und der Latenzphase der Epileptogenese präventiv eingegriffen werden. In künftigen Studien könnte dies z. B. durch die Anwendung spezifischer monoklonaler Antikörper getestet werden.

Des Weiteren konnten im Zusammenhang mit der Zelladhäsion eine Regulation der Proteine ITGA1 und TLN1 nachgewiesen werden. TLN1 verknüpft durch die Bindung von Integrinen die Plasmamembran mit zytoskelettalen Strukturen bzw. der extrazellulären Matrix (CRITCHLEY 2009). In der vorliegenden Studie wurde TLN1 im HC in der Post-Insult- und der Latenzphase sowie im PHC ebenfalls zehn Tage nach SE und in der chronischen Phase als differentiell exprimiert identifiziert. ITGA1 zeigte zusammen mit TLN1 eine Heraufregulati-

on im PHC während der Latenzphase. Das Protein TLN1 sowie Integrine sind als spezielle Signalmoleküle bei Zelladhäsionsprozessen während der Angiogenese notwendig. Es konnte gezeigt werden, dass das Fehlen von TLN1 in Endothelzellen durch eine Tamoxifen-induzierte Inaktivierung des TLN1-Gens zu einem angiogenetischen Phänotyp führt, der die Bildung neuer Blutgefäße limitiert (MONKLEY et al. 2011). Tierexperimentell konnte durch die Verwendung von ITGA1-*knock-out*-Mäusen festgestellt werden, dass das Fehlen von ITGA1 zwar eine normale vaskuläre Entwicklung, aber eine reduzierte adulte Angiogenese zur Folge hat (AVRAAMIDES et al. 2008). Die Überexpression von TLN1 und ITGA1 während der Epileptogenese könnte auf die Zelladhäsion während angiogenetischer Prozesse, insbesondere in der Latenzphase, hindeuten. Vitorino et al. entdeckten 2015 den *Mitogen-activated Protein kinase kinase kinase kinase 4* (MAP4K4)–*Moesin–Talin– β 1-Integrin*-Signalweg, der ein vielversprechendes Target zur therapeutischen Unterdrückung einer pathologischen Angiogenese darstellt. Die MAP4K4-abhängige Moesin-Aktivität scheint die Integrinfunktion durch Zerstörung der Bindung von *Talin* an *β 1-Integrin* zu hemmen. Damit stellten sie ein neues antiangiogenetisches Konzept vor (SAHARINEN u. IVASKA 2015; VITORINO et al. 2015). In zukünftigen Untersuchungen könnte z. B. durch Verwendung von MAP4K4-Antagonisten getestet werden, ob der Eingriff in diesen Signalweg eine geeignete antiangiogenetische Therapie während der Epileptogenese, insbesondere in der Latenzphase, darstellt.

Die GTP-asen RASA1, HRAS, CDC42 und RAB5A sowie der Kalium-Ionenkanal KCNMA1, die Metalloproteinase ADAM17 und die Guanylatcyclase GUCY1B3 sind ebenfalls an der Regulation der Angiogenese beteiligt, die vor allem durch VEGF vermittelt wird. In der vorliegenden Studie zeigten alle Proteine eine verringerte Expression insbesondere im PHC während der Latenzphase der Epileptogenese. Die GTP-ase RASA1 fungiert als negativer Regulator der Angiogenese (LAPINSKI et al. 2012). Es konnte festgestellt werden, dass eine verringerte Expression von RASA1 für die Angiogenese benötigt wird (ANAND et al. 2010). Die Herunterregulierung von RASA1 im HC und im PHC während der Post-Insult- und im PHC während der Latenzphase weist demnach möglicherweise auf eine gesteigerte Angiogenese durch RASA1 hin. Die kleine GTP-ase CDC42 ist involviert in die VEGF2-vermittelte Signaltransduktion zur Formation von Blutgefäßen. Es konnte festgestellt werden, dass CDC42 während der Bildung neuer Blutgefäße beteiligt ist sowohl an der Migration als auch am Überleben von Endothelzellen. Eine Inaktivierung von CDC42 führt demnach zu einer defekten Vaskulogenese in Endothelzellen (JIN et al. 2013b). Die beiden CDC42-Isoformen CDC42-201 und CDC42-202 waren im PHC während der Post-Insult-Phase sowie der Latenzphase herunterreguliert, wohingegen CDC42-202 im HC während der frühen Post-Insult-

Phase heraufreguliert war. Das unterschiedliche Expressionsmuster der CDC42-Isoformen im HC und im PHC weist möglicherweise auf eine unterschiedliche Funktion von CDC42 in beiden Geweben hin. Die Herunterregulierung im PHC ist möglicherweise ein Gegenregulationsmechanismus des Körpers, der der Induktion von VEGF direkt nach einem epileptischen Insult sowie in der Latenzphase entgegenwirkt. Die Heraufregulierung im HC könnte hingegen den proangiogenetischen Signalweg von VEGF/VEGFR2 nach dem initialen Insult fördern. Aufgrund der entgegengesetzten Expression in beiden Geweben scheint CDC-42 als mögliches Target antiangiogenetischer Strategien weniger geeignet zu sein.

RAB5A reguliert das VEGFR2-Trafficking in frühen und späten Endosomen. Daher könnte eine VEGFR2-vermittelte Regulation der endothelialen Funktion von der RAB5A-vermittelten GTP-Hydrolyse-Aktivität abhängig sein, die für das endosomale Trafficking benötigt wird (JOPLING et al. 2009a). Im PHC konnte in der Latenzphase eine Herunterregulierung der GTP-ase RAB5A nachgewiesen werden. Dies weist möglicherweise auf eine gestörte Endozytose in Endothelzellen während der Latenzphase der Epileptogenese hin, was in künftigen Studien weiter abgeklärt werden sollte.

Der VEGF-vermittelte Signalweg moduliert die Funktion von Endothelzellen über HRAS. Die Aktivierung von HRAS an Endomembranen ist für einen VEGF-vermittelten Signalweg zur Kontrolle der angiogenetischen Antwort via PI3K, AKT und eNOS Phosphorylierung notwendig. Die Phosphorylierungsprozesse führen zur Endothelzellmigration (HAEUSSLER et al. 2013). HRAS, ADAM17 und KCNMA1 waren in unserer Studie im PHC zehn Tage nach SE herunterreguliert. Während der Angiogenese im Gehirn aktiviert VEGF durch Bindung an VEGFR2 die Proteine IP3, eNOS und PLC, was zur Proteolyse der vaskulären Basalmembran durch Kollagenasen, Heparinasen, Plasminogen und die Metalloproteinasen MMP2 und MMP9 führt (MARCHI u. LERNER-NATOLI 2013). Zudem konnte festgestellt werden, dass auch ADAM17 die Metalloproteinase MMP2 aktiviert und so an der Bildung neuer Blutgefäße beteiligt ist (GÖÖZ et al. 2009). Inhibitoren der Expression und Funktion von Metalloproteinasen hemmen die Angiogenese verschiedener In-vivo- und In-vitro-Modelle. Diese Studien identifizierten unter anderem die Metalloproteinase ADAM17 als wichtigen angiogenetischen Faktor (RUNDHAUG 2005). Für den Calcium-aktivierenden Kaliumkanal KCNMA1 konnte eine Beteiligung an der VEGF-Sekretion und an der endothelialen Zellproliferation festgestellt werden (NINGARAJ et al. 2009).

Neben den bereits erwähnten Proteinen ist in diesem Zusammenhang die Herunterregulierung des Proteins GUCY1B3 im PHC während der Post-Insult-Phase der Epileptogenese interessant. GUCY1B3 katalysiert die Umwandlung von GTP zu zyklischem Guanosinmonophos-

phat (cGMP) und fungiert als Hauptrezeptor für NO (ZABEL et al. 1998). NO stellt einen Induktor von VEGF dar. In Zelllinien von humanen Gliomen konnte eine Reduzierung von cGMP sowie eine verringerte Expression von VEGF durch Transfektion der *antisense*-RNA von GUCY1B3 festgestellt werden. Dies hat eine Hemmung der angiogenetischen Aktivität zur Folge (SAINO et al. 2004). Möglicherweise könnte auch GUCY1B3 während der Epileptogenese eine Zielstruktur zur Kontrolle der Neovaskularisierung darstellen.

Die Herunterregulierung der Proteine HRAS, ADAM17, KCNMA1 sowie GUCY1B3 könnte auf eine zelleigene Schutzreaktion durch eine erhöhte VEGF-vermittelte Angiogenese während der Post-Insult- bzw. der Latenzphase der Epileptogenese hindeuten.

Die Adapterproteine CRK und GRB sind an der Zellmigration durch Signaltransduktion von Zelloberflächenrezeptoren wie VEGF beteiligt (TARI u. LOPEZ-BERESTEIN 2001; STOLETOV et al. 2004; BRAIMAN u. ISAKOV 2015). CRK und GRB zeigen eine Herunterregulierung im HC und im PHC zehn Tage nach SE. Es wurde bereits nachgewiesen, dass GRB2 eine zeitabhängige Induktion im Gyrus dentatus vier und acht Stunden nach elektrokonvulsiven Anfällen zeigt und den Basallevel wieder nach 24 Stunden erreicht. Dies lässt auf eine erhöhte Regulation von Wachstumsfaktoren-abhängigen Signalwegen nach elektrokonvulsiven Anfällen schließen (NEWTON et al. 2004). Unsere Studie zeigt darüber hinaus, dass die Expression von GRB2 auf Kontrollniveau auch nach 48 Stunden anhält und in der Latenzphase abfällt. Eine verringerte Expression von CRK und GRB2 könnte auf Kompensationsmechanismen in Reaktion auf eine vermehrte Wachstumsfaktoren-vermittelte Regulation während der Latenzphase hinweisen.

Die Proteine DDX6 und ADRBK1 sind während der Latenzphase der Epileptogenese heraufreguliert. Die RNA-Helicase DDX6 bindet spezifisch die mRNA 5'UTR (*untranslated region*) von VEGF und reguliert dadurch in vitro und in vivo die Translokation der VEGF-mRNA. Die Abnahme von DDX6 während hypoxischen In-vitro-Zuständen verbessert die VEGF-Sekretion und dadurch die Angiogenese (DE VRIES et al. 2013). Rivas et al. konnten 2013 nachweisen, dass ADRBK1 in der Regulation der Tumor-assoziierten Angiogenese involviert ist. Eine Herunterregulierung von ADRBK1 verbessert in vitro die Migration von Endothelzellen (RIVAS et al. 2013). Die signifikant verringerten Expressionslevel von GRB2, CRK und die Heraufregulierung von DDX6 und ADRBK1 während der Latenzphase der Epileptogenese im PHC könnten auf eine zelleigene Antwort hindeuten, die den Wachstumsfaktoren-vermittelten Regulationsmechanismen entgegenwirkt.

Außerdem zeigte sich die Heraufregulierung des Proteins PTRF in beiden Geweben während der Latenz- sowie im PHC in der chronischen Phase. Es konnte gezeigt werden, dass die Ex-

pression von PTRF in Prostatatumorzellen essentielle Schritte der Angiogenese wie Endothelzellmigration, -proliferation und Gefäßformation hemmt. Die PTRF-Expression reduziert die MMP9-Produktion, IL-6 sowie die Sekretion von *Caveolae* in Prostatatumorzellen (AUNG et al. 2011; INDER et al. 2012; NASSAR et al. 2013; MOON et al. 2014). In künftigen Studien sollte untersucht werden, ob eine Überexpression von PTRF während der Latenz- und der chronische Phase einen antiangiogenetischen Effekt aufweist und ein interessantes Target darstellen könnte.

Die funktionelle Datenanalyse der Wachstumsfaktoren-assoziierten Proteine sowie *pathways* deuten vor allem darauf hin, dass die Angiogenese während der Epileptogenese sowie in der klinisch manifestierten Epilepsie einen komplexen und fein regulierten Prozess darstellt, der auf der Balance pro- und antiangiogenetischer Regulationsmechanismen beruht. In diesem Kontext kommt vor allem dem PHC während der Latenzphase der Epileptogenese eine besondere Bedeutung zu.

In künftigen Studien sollte weiterhin abgeklärt werden, ob durch Modulation erwähnter *pathways* bzw. Proteine, insbesondere während der Latenzphase der Epileptogenese, in die Progression einer Epilepsieerkrankung präventiv eingegriffen werden kann.

Im Hinblick auf den Einsatz von Antikörpern als präventive Strategie ist zu berücksichtigen, dass die BHS für Antikörper weitgehend undurchlässig ist. Es existieren einige Konzepte zur Überwindung der BHS, deren praktische Anwendung zum Teil vielversprechende Ansätze darstellen (TERASAKI et al. 1991; MOOS u. MORGAN 2001; RAPOPORT 2001; JAHNKE et al. 2008; SZETO 2008). Außerdem ist zu erwähnen, dass nach einem Insult die BHS gestört ist, wodurch sie durchlässiger für Substanzen im Blut sein könnte. Dies könnte auch für den Einsatz von Antikörpern genutzt werden.

Regulation ABC-Transporter-assoziiierter *pathways* und Proteine

ABC-Transporter sind ein wichtiger funktioneller Bestandteil der BHS. Falls sie an der luminalen Seite von Endothelzellen der BHS exprimiert sind, erfüllen sie durch den Auswärtstransport potentiell neurotoxischer endogener oder xenobiotischer Moleküle eine neuroprotektive Funktion (ABBOTT et al. 2010).

Im Rahmen der vorliegenden Studie wurde zehn Tage nach SE ein erhöhter Expressionslevel von ABCB1A, das neben ABCB1B den Transporter Pgp bei der Maus und der Ratte codiert, im PHC der Ratten nachgewiesen. Allerdings ist im Rahmen der vorliegenden Studie lediglich ABCB1A von Interesse, da nur ABCB1A in Gehirnkapillaren von Mäusen und Ratten

lokalisiert ist und sich ABCB1B ausschließlich im Gehirnparenchym befindet (DEMEULE et al. 2002). In einem SE-Kainat-Modell, in dem chemisch ein initialer Insult gesetzt wird, konnte ein signifikanter Anstieg von Pgp im HC, nicht aber in parahippocampalen Strukturen von Ratten festgestellt werden (SEEGERS et al. 2002c). Rizzi et al. (2002) wiesen in einer In-vivo-Studie an Mäusen eine erhöhte mRNA-Expression von Pgp im HC nach drei und 24 Stunden sowie nach drei Monaten nach einem initialen Insult nach. 72 Stunden nach SE stellten sie keine Veränderung der mRNA Expression fest (RIZZI et al. 2002). Auch in der vorliegenden Studie konnte ABCB1A im HC während der Post-Insult-Phase und der Latenzphase sowie im PHC während der frühen Post-Insult-Phase identifiziert werden. Das Protein war aber nicht differentiell exprimiert. Die vorliegende Studie stärkt die Vermutung, dass die Induktion von Pgp transient erfolgt, weshalb eine erhöhte Expression sowie die Regulierung ABCB-assoziiierter *pathways* in der chronischen Phase nicht mehr nachweisbar ist (SEEGERS et al. 2002c; POTSCHKA 2010c).

Neben Pgp sind auch einige MRP-Transporter sowie BCRP (ABCG2) am aktiven Efflux-Transport an der BHS involviert (ABBOTT et al. 2010). In der vorliegenden Studie konnte im PHC in der chronischen Phase der regulierte *pathway ATP binding cassette, sub family C* identifiziert werden. Die Subfamilie C der ABC-Transporter repräsentiert die MRP-Familie. Darüber hinaus konnte eine Regulierung des *pathways ATP binding cassette, sub family G* im HC in der Post-Insult-Phase und im PHC in der chronischen Phase nachgewiesen werden. Von den fünf Vertretern der ABCG-Familie zählt nur der Transporter BCRP, der von dem Gen ABCG2 codiert wird, wie Pgp und MRP2 zu den sog. *Multidrug*-Transportern. In einer In-vivo-Studie an Ratten konnte eine erhöhte Expression der ABC-Transporter MRP1, MRP2 und BCRP direkt nach einem elektrisch gesetzten initialen Insult in limbischen Strukturen wie dem HC und dem PHC und in chronisch epileptischen Tieren im piriformen, entorhinalen und perirhinalen Cortex des PHC nachgewiesen werden (VAN VLIET et al. 2005). Eine weitere tierexperimentelle Studie an Ratten bestätigte eine Überexpression von MRP2 nach einem Pilocarpin-induzierten SE (HOFFMANN et al. 2006). Der Grund, dass ein signifikanter Expressionslevel der Vertreter der ABCC- und ABCG-Transporter nicht identifiziert wurde, könnte in der Untersuchung des Gewebes zu punktuellen Zeitpunkten begründet sein.

Die Regulation der ABCC- und ABCG-Transporter assoziierten *pathways* sowie die differentielle Expression von ABCB1A ist aus klinischer Sicht besonders relevant. Aufgrund ihrer Lokalisation an der BHS wird eine Überexpression der ABC-Transporter Pgp, BCRP und MRP2 mit einer verringerten Gehirngängigkeit vieler Medikamente in Verbindung gebracht. Dies kann zur Ausbildung einer Pharmakoresistenz beitragen (LÖSCHER u. POTSCHKA

2005b; LÖSCHER u. POTSCHKA 2005a). So konnte eine Überexpression von Pgp im Hirngewebe von Patienten mit pharmakoresistenter Epilepsie nachgewiesen werden (TISHLER et al. 1995; SISODIYA et al. 1999; DOMBROWSKI et al. 2001; ARONICA et al. 2004; LAZAROWSKI et al. 2004; KUBOTA et al. 2006; AK et al. 2007). Neben Pgp wurde auch eine vermehrte Expression von Vertretern der MRP-Familie im epileptischen Gehirn festgestellt (DOMBROWSKI et al. 2001; KUBOTA et al. 2006). Darüber hinaus konnte in diversen experimentellen Studien eine Kausalität zwischen einer vermehrten Expression von Pgp und einer Pharmakoresistenz gegenüber AE, die mit hoher Wahrscheinlichkeit Pgp-Substrate darstellen, hergestellt werden (RIZZI et al. 2002; POTSCHKA et al. 2004; MARCHI et al. 2005; VOLK u. LOSCHER 2005; BRANDT et al. 2006; VAN VLIET et al. 2006; CUCULLO et al. 2007; VAN VLIET et al. 2007b; WEN et al. 2008). Zwar wurde in unserer Studie dieser Zusammenhang nicht untersucht, aber in Verbindung mit den bisherigen Erkenntnissen stützt es die Hypothese einer anfallsbedingten Hochregulierung von ABC-Transportern und einer damit assoziierten Transporter-bedingten Pharmakoresistenz gegenüber AE.

Interessanterweise konnte in unserer Studie eine Überexpression von Proteinen nachgewiesen werden, die wichtige zytoskelettale Strukturen mit der Zellmembran verbinden (SATO et al. 1992). EZR und RDX gehören mit Moesin zu den sog. ERM-Proteinen, die involviert sind in der Integration verschiedener ABC-Transporter in die kanalikuläre Membran (KAWASE et al. 2014). In der vorliegenden Studie wurde eine vermehrte Expression von RDX im HC zehn Tage nach SE und im PHC acht Wochen nach SE identifiziert. Außerdem war das Protein EZR im PHC in der Post-Insult-, der Latenz- und der chronischen Phase differentiell exprimiert. Unsere Ergebnisse stützen die Hypothese einer relevanten Funktion der Proteine EZR und RDX an der apikalen Integration von MRP2 (KIKUCHI et al. 2002; YANG et al. 2007) sowie von Pgp durch RDX (WANG et al. 2006; KANO et al. 2011; YANO et al. 2013b). Die erhöhte Expression von EZR und RDX könnte darauf hindeuten, dass EZR und RDX wichtige Faktoren in der posttranskriptionalen Regulation von MRP2 und Pgp durch die Verankerung in der Zellmembran während der Epileptogenese darstellen.

Regulation der Expression von Tight-Junction-Proteinen

Die Endothelzellen der BHS sind im apikalen Bereich der Zellen über Tight Junctions miteinander verbunden. Dies reduziert den parazellulären Übertritt polarer Substanzen vom Blutplasma in das Gehirn und stellt dadurch eine Schutzfunktion des Gehirns dar (ABBOTT et al. 2010). Zahlreiche Studien weisen auf eine erhöhte BHS-Permeabilität während epileptischer

Anfälle hin, die über mehrere Tage bis Wochen andauert (YAFFE et al. 1995; LANSBERG et al. 1999; AMATO et al. 2001; HONG et al. 2004; PAVLOVSKY et al. 2005; TOMKINS et al. 2008; ALVAREZ et al. 2010; IVENS et al. 2010). Eine Dysfunktion der BHS ist dabei assoziiert mit einer veränderten Expression von Tight-Junction-Proteinen (MORIN-BRUREAU et al. 2011; KIM et al. 2012; DEVINSKY et al. 2013). In der vorliegenden Studie zeigten die zytoplasmatischen Tight-Junction-Proteine TJP1 und TJP2 eine Heraufregulierung während der chronischen Phase im PHC sowie des Proteins TJP2 während der Latenzphase im HC. Zudem zeigten auch die transmembranären Tight-Junction-Proteine JAM3, ESAM und CLDND1 eine vermehrte Expression. JAM3 war während der Post-Insult-Phase und der Latenzphase im HC und in der chronischen Phase im PHC vermehrt reguliert. ESAM zeigte während der Post-Insult-Phase im HC und CLDND1 während der Latenzphase im PHC eine Heraufregulation. Dies bestätigt die Beobachtung einer dysfunktionalen BHS in der frühen Phase der Epileptogenese (SEIFFERT et al. 2004; MARCHI et al. 2007; RIGAU et al. 2007). Zudem weist dies auf eine dysfunktionale BHS während der Latenzphase sowie acht Wochen nach SE hin. Die vermehrte Expression dieser Tight-Junction-Proteine deutet möglicherweise auf Kompensationsmechanismen in Folge einer durch einen epileptischen Insult und durch epileptische Anfälle verursachten dysfunktionalen BHS hin.

Wie bereits erwähnt führt die Überproduktion von VEGF zu einer erhöhten Permeabilität der BHS. Nach epileptischen Anfällen kommt es über die VEGF/VEGFR2-Signalkaskade zu einer Degradation von Tight Junctions der BHS durch die Proteine SRC, PI3K und p38MAP (MARCHI u. LERNER-NATOLI 2013). Es konnte bereits festgestellt werden, dass anti-VEGFR-Antikörper den Abbau von Tight Junctions reduzieren (MORIN-BRUREAU et al. 2011). Außerdem kann die Degradation von Tight Junctions durch SRC-Inhibitoren verhindert werden (MORIN-BRUREAU et al. 2011). In künftigen Studien sollten weitere antiangiogenetische Strategien durch die selektive Hemmung des proangiogenetischen Signalweges, der durch die Proteine SRC, PI3K und p38MAP vermittelt wird, geprüft werden.

VII. ZUSAMMENFASSUNG

Epilepsien zählen bei Hund und Katze sowie beim Menschen zu den häufigsten chronischen Erkrankungen des zentralen Nervensystems (ZNS). Etwa ein Drittel der veterinär- und humanmedizinischen Epilepsiepatienten sprechen nicht zufriedenstellend auf eine antikonvulsive Therapie mit Antiepileptika (AE) an. Aus diesem Grund ist die Erforschung der zugrunde liegenden Mechanismen, die zur Entwicklung einer pharmakoresistenten Epilepsie führen, von besonderem Interesse. Es gibt Hinweise, dass AE die Expression von *ATP-binding cassette* (ABC)-Transportern an der Blut-Hirn-Schranke (BHS) induzieren. Dadurch könnte im Gehirn die therapeutisch wirksame Konzentration von AE nicht mehr erreicht werden. Deshalb wurde im Rahmen der vorliegenden Studie an isolierten Gehirnkapillaren von Schweinen die Regulation von P-Glykoprotein (Pgp), *breast cancer resistance protein* (BCRP) und *multidrug resistance-associated protein 2* (MRP2) durch eine ein-, drei- und fünfstündige Exposition mit Phenobarbital (PB), Carbamazepin (CBZ) und Topiramat (TPM) in therapeutisch relevanten Konzentrationen untersucht.

Durch die Studie konnte gezeigt werden, dass eine drei- und eine fünfstündige Exposition mit PB und CBZ eine erhöhte Transportaktivität von Pgp zur Folge hatte. Eine Inkubation mit beiden AE führte zu einer erhöhten Transportaktivität von MRP2 zu allen drei Zeitpunkten. Die Transportaktivität von MRP2 war nach einer drei- und fünfstündigen Inkubation mit TPM erniedrigt. Für BCRP konnte eine verringerte Transportaktivität nach Exposition mit PB nach fünf Stunden und mit TPM nach drei und fünf Stunden festgestellt werden. Die Proteinexpression von Pgp war nach einer dreistündigen Inkubation mit PB und TPM nicht verändert, es zeigte sich jedoch eine verringerte Proteinexpression nach einer dreistündigen Exposition mit CBZ. Nach Zugabe von PB, CBZ und TPM konnte keine Veränderung der Proteinexpression von BCRP nachgewiesen werden.

In den Transport-Studien der vorliegenden Arbeit wurde erstmals eine Regulation von Pgp, BCRP und MRP2 durch PB, CBZ und TPM in therapeutisch relevanten Konzentrationen an isolierten porcinen Gehirnkapillaren nachgewiesen. Die Effekte der AE auf die Funktion von Pgp, BCRP und MRP2 könnten Auswirkungen auf die Aufnahme dieser Medikamente in das Gehirn haben und damit die Therapie von Epilepsien und anderen ZNS-Erkrankungen beeinflussen. Die Regulation der Transporter durch die AE könnte zudem einen Einfluss auf die protektive Funktion der BHS gegenüber toxischen Fremdstoffen haben.

In künftigen Studien sollte die Regulation von BCRP und MRP2 an der BHS nach einer Langzeit-Applikation von AE untersucht werden.

Die Identifizierung geeigneter Zielstrukturen und Biomarker sowie das Verständnis der pathophysiologischen Prozesse während der Epileptogenese stellen die Basis für die Entwicklung präventiver Strategien in der Epilepsieforschung dar. Proteomische Studien können dazu beitragen, epileptogenese-assoziierten zellulären und molekularen Veränderungen sowie neue Therapiestrukturen zu identifizieren. Anhand zahlreicher tierexperimenteller Studien konnte ein direkter Zusammenhang zwischen einer Dysfunktion der BHS und der Epileptogenese hergestellt werden. Ferner wurde festgestellt, dass eine anhaltende Anfallsaktivität eine vermehrte Expression von ABC-Transportern an der BHS verursacht. Deshalb wurde das Proteom des Hippocampus (HC) und des parahippocampalen Cortex (PHC) von Ratten auf BHS-assoziierte Veränderungen während der Epileptogenese untersucht.

In der vorliegenden Studie konnte eine Regulierung Wachstumsfaktoren-assoziiierter Proteine und *pathways*, insbesondere im PHC während der Latenzphase, nachgewiesen werden. In diesem Zusammenhang wurde das differentiell exprimierte Protein *nucleolin* identifiziert, das als angiogenetischer Marker fungiert. Zur Validierung der Proteomdaten, aber auch zur Bestimmung der anatomischen und zellulären Verteilung von *nucleolin* wurde eine immunhistochemische Färbung etabliert. Eine abschließende Quantifizierung der Expression von *nucleolin* auf zellulärer Ebene muss noch durchgeführt werden.

Darüber hinaus zeigten sich vor allem im PHC eine Regulierung ABC-Transporter-assoziiierter Proteine und *pathways* sowie eine Heraufregulierung von ABCB1A während der Latenzphase. Zudem wurde eine vermehrte Expression Tight Junction-assoziiierter Proteine während der drei Phasen festgestellt.

Die Ergebnisse dieser Studie weisen darauf hin, dass die Angiogenese auch während der Epileptogenese einen komplexen und fein regulierten Prozess darstellt, der auf der Balance pro- und antiangiogenetischer Regulationsmechanismen beruht. Außerdem liefert die Studie neue Erkenntnisse über molekulare angiogenese-assoziierte Veränderungen während der Epileptogenese. Sie deutet darüber hinaus auf eine Anfalls-assoziierte Regulation von ABC-Transportern und auf eine Dysfunktion der BHS während der Epileptogenese hin.

Für die Zukunft bleibt zu untersuchen, ob die identifizierten Angiogenese- und Tight Junction-assoziierten Proteine geeignete Targets in der medikamentellen Behandlung und Prävention von Epilepsien darstellen könnten. Die vorliegende Studie bietet eine Basis für weitere Untersuchungen und Charakterisierungen geeigneter Biomarker und Zielstrukturen.

VIII. SUMMARY

Epilepsies are one of the most common chronic neurologic disorders in dogs and cats as well as in humans. However, about one third of veterinary and human patients with epilepsy respond poorly to pharmacotherapy. For this reason, it is of particular interest to investigate the underlying mechanisms of pharmacoresistant epilepsy. Evidence exists that AEDs themselves induce the expression of ATP-binding-cassette (ABC) transporters at the BBB. Thus, therapeutic effective concentrations of the AEDs couldn't be reached at their site of action. Therefore, within the scope of this study we investigate the regulation of P-Glycoprotein (Pgp), breast cancer resistance protein (BCRP) and multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2) in isolated porcine brain capillaries after exposure to therapeutically relevant concentrations of phenobarbital (PB), carbamazepine (CBZ) and topiramate (TPM) for one, three and five hours.

This study shows that exposing isolated porcine brain capillaries to PB and CBZ for three and five hours significantly increased transport activity of Pgp. Incubation with PB and CBZ results in increased transport activity of MRP2 at all three time points. Transport activity of MRP2 was decreased after incubation with TPM for three and five hours. PB exposure for five hours and TPM exposure for three and five hours decreased transport activity of BCRP. Protein expression of Pgp showed no difference after three hour incubation with PB or TPM. However, exposure to CBZ for three hours demonstrated a decreased protein expression level of Pgp. Incubation with PB, CBZ and TPM had no effect on protein expression levels of BCRP.

For the first time, this study reveals the regulation of Pgp, BCRP and MRP2 in isolated porcine brain capillaries after the exposure to therapeutically relevant concentrations of PB, CBZ and TPM. The effects of these AEDs on the function of Pgp, BCRP and MRP2 affect brain drug delivery. This could influence the pharmacological therapy of epilepsies and other CNS disorders. The regulation of the respective ABC transporters by AEDs could also have an impact on the protective function of the BBB against toxic environmental compounds.

However, further studies are needed to examine the regulation of BCRP and MRP2 at the BBB after long-term application of AEDs.

The identification of ideally suited target structures and biomarkers as well as the pathophysiological understanding of epileptogenesis provide the basis for the development of approaches to prevent epilepsy. Proteomic profiling contributes to the identification of detailed cellular and molecular alterations associated with epileptogenesis and new therapeutic targets. Vari-

ous *in vivo* studies have demonstrated that BBB dysfunction is associated with epileptogenesis. Moreover, persistent seizure activity causes an overexpression of ABC transporters at the BBB. Therefore, the proteome of hippocampal (HC) and parahippocampal cortex (PHC) tissue of rats was analysed with regard to BBB alterations during epileptogenesis.

This study revealed a regulation of proteins and pathways associated with growth factors, especially in the PHC during the latency phase. In this context, the differentially expressed protein nucleolin was identified. Nucleolin is used as an angiogenetic marker. An immunohistochemical staining was established to validate the proteomic data and to determine the anatomical and cellular distribution of nucleolin. A final quantification of the cellular expression of nucleolin has not yet been performed.

In addition, ABC transporter-associated proteins and pathways as well as ABCB1A were upregulated in particular in the PHC during the latency phase. Furthermore, an increased expression of tight junction-associated proteins was demonstrated during all three phases.

The results of this study indicate that angiogenesis during epileptogenesis is a complex and fine-tuned process based on the balance of pro- and antiangiogenic regulatory mechanisms. In addition, the study allows new insights into molecular angiogenesis-associated alterations. It also provides evidence of seizure-associated regulation of ABC transporters and of a dysfunctional BBB during epileptogenesis.

Further research is needed in order to functionally characterize the identified proteins associated with angiogenesis or BBB dysfunction as therapeutic target for the medical treatment or prevention of epileptogenesis. This analysis provides a basis for further investigations and characterisations of suitable biomarkers and target structures.

IX. LITERATURVERZEICHNIS

ABBOTT, N. J. (2005): Dynamics of CNS barriers: evolution, differentiation, and modulation. *Cell Mol Neurobiol* 25, 5-23

ABBOTT, N. J., A. A. PATABENDIGE, D. E. DOLMAN, S. R. YUSOF u. D. J. BEGLEY (2010): Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiology of disease* 37, 13-25

ABBOTT, N. J., L. RONNBACK u. E. HANSSON (2006): Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nature reviews. Neuroscience* 7, 41-53

AGARWAL, S., A. M. HARTZ, W. F. ELMQUIST u. B. BAUER (2011): Breast cancer resistance protein and P-glycoprotein in brain cancer: two gatekeepers team up. *Curr Pharm Des* 17, 2793-2802

AHMAD, S., P. W. HEWETT, P. WANG, B. AL-ANI, M. CUDMORE, T. FUJISAWA, J. J. HAIGH, F. LE NOBLE, L. WANG, D. MUKHOPADHYAY u. A. AHMED (2006): Direct evidence for endothelial vascular endothelial growth factor receptor-1 function in nitric oxide-mediated angiogenesis. *Circ Res* 99, 715-722

AK, H., B. AY, T. TANRIVERDI, G. Z. SANUS, M. IS, M. SAR, B. OZ, C. OZKARA, E. OZYURT u. M. UZAN (2007): Expression and cellular distribution of multidrug resistance-related proteins in patients with focal cortical dysplasia. *Seizure* 16, 493-503

AKAMATSU, N. u. S. TSUJI (2011): Deep brain stimulation for epilepsy. *Brain Nerve* 63, 365-369

ALMS, D., M. FEDROWITZ, K. RÖMERMAN, A. NOACK u. W. LÖSCHER (2014): Marked differences in the effect of antiepileptic and cytostatic drugs on the functionality of p-glycoprotein in human and rat brain capillary endothelial cell lines. *Pharmaceutical research* 31, 1588-1604

ALTHAUS, F. R. u. H.-H. FREY (2007): *Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin: 131 Tabellen*. Georg Thieme Verlag,

ALVAREZ, V., P. MAEDER u. A. O. ROSSETTI (2010): Postictal blood-brain barrier breakdown on contrast-enhanced MRI. *Epilepsy Behav* 17, 302-303

ALZATE, O. (2010): *Neuroproteomics*. CRC Press,

AMATO, C., M. ELIA, S. A. MUSUMECI, P. BISCEGLIE u. M. MOSCHINI (2001): Transient MRI abnormalities associated with partial status epilepticus: a case report. *Eur J Radiol* 38, 50-54

AMBROZIAK, K., K. KUTEYKIN-TEPLYAKOV, C. LUNA-TÓRTOS, M. AL-FALAH, M. FEDROWITZ u. W. LÖSCHER (2010): Exposure to antiepileptic drugs does not alter the functionality of P-glycoprotein in brain capillary endothelial and kidney cell lines. *European journal of pharmacology* 628, 57-66

ANAND, S., B. K. MAJETI, L. M. ACEVEDO, E. A. MURPHY, R. MUKTHAVARAM, L. SCHEPPKE, M. HUANG, D. J. SHIELDS, J. N. LINDQUIST, P. E. LAPINSKI, P. D. KING, S. M. WEIS u. D. A. CHERESH (2010): MicroRNA-132-mediated loss of

p120RasGAP activates the endothelium to facilitate pathological angiogenesis. *Nature medicine* 16, 909-914

ARBAIZAR, B., T. DIERSEN-SOTOS, I. GOMEZ-ACEBO u. J. LLORCA (2010): Topiramate in the treatment of alcohol dependence: a meta-analysis. *Actas Esp Psiquiatr* 38, 8-12

ARONICA, E., J. A. GORTER, G. H. JANSEN, C. W. VAN VEELLEN, P. C. VAN RIJEN, S. LEENSTRA, M. RAMKEMA, G. L. SCHEFFER, R. J. SCHEPER u. D. TROOST (2003): Expression and cellular distribution of multidrug transporter proteins in two major causes of medically intractable epilepsy: focal cortical dysplasia and glioneuronal tumors. *Neuroscience* 118, 417-429

ARONICA, E., J. A. GORTER, M. RAMKEMA, S. REDEKER, F. OZBAS-GERCEKER, E. A. VAN VLIET, G. L. SCHEFFER, R. J. SCHEPER, P. VAN DER VALK, J. C. BAAYEN u. D. TROOST (2004): Expression and cellular distribution of multidrug resistance-related proteins in the hippocampus of patients with mesial temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* 45, 441-451

ARONICA, E., J. A. GORTER, S. REDEKER, E. A. VAN VLIET, M. RAMKEMA, G. L. SCHEFFER, R. J. SCHEPER, P. VAN DER VALK, S. LEENSTRA, J. C. BAAYEN, W. G. SPLIET u. D. TROOST (2005): Localization of breast cancer resistance protein (BCRP) in microvessel endothelium of human control and epileptic brain. *Epilepsia* 46, 849-857

AUNG, C. S., M. M. HILL, M. BASTIANI, R. G. PARTON u. M. O. PARAT (2011): PTRF-cavin-1 expression decreases the migration of PC3 prostate cancer cells: role of matrix metalloprotease 9. *Eur J Cell Biol* 90, 136-142

AVRAAMIDES, C. J., B. GARMY-SUSINI u. J. A. VARNER (2008): Integrins in angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nat Rev Cancer* 8, 604-617

BAGLEY, R. (2005): Clinical evaluation and management of animals with seizures. Bagley, RS "Fundamentals of Veterinary Clinical Neurology". USA, Blackwell Publishing 363-376

BALDA, M. S., L. GONZALEZ-MARISCAL, K. MATTER, M. CEREIJIDO u. J. M. ANDERSON (1993): Assembly of the tight junction: the role of diacylglycerol. *J Cell Biol* 123, 293-302

BALTES, S., A. M. GASTENS, M. FEDROWITZ, H. POTSCHKA, V. KAEVER u. W. LOSCHER (2007): Differences in the transport of the antiepileptic drugs phenytoin, levetiracetam and carbamazepine by human and mouse P-glycoprotein. *Neuropharmacology* 52, 333-346

BANKSTAHL, J. P., K. HOFFMANN, K. BETHMANN u. W. LOSCHER (2008): Glutamate is critically involved in seizure-induced overexpression of P-glycoprotein in the brain. *Neuropharmacology* 54, 1006-1016

BATES, S. E., S. J. CURRIER, M. ALVAREZ u. A. T. FOJO (1992): Modulation of P-glycoprotein phosphorylation and drug transport by sodium butyrate. *Biochemistry* 31, 6366-6372

BATES, S. F., C. CHEN, R. ROBEY, M. KANG, W. D. FIGG u. T. FOJO (2002): Reversal of multidrug resistance: lessons from clinical oncology. *Novartis Found Symp* 243, 83-96; discussion 96-102, 180-105

BAUER, B., A. M. HARTZ, G. FRICKER u. D. S. MILLER (2004): Pregnane X receptor up-regulation of P-glycoprotein expression and transport function at the blood-brain barrier. *Mol Pharmacol* 66, 413-419

BAUER, B., A. M. HARTZ, G. FRICKER u. D. S. MILLER (2005): Modulation of p-glycoprotein transport function at the blood-brain barrier. *Exp Biol Med (Maywood)* 230, 118-127

BAUER, B., A. M. HARTZ, J. R. LUCKING, X. YANG, G. M. POLLACK u. D. S. MILLER (2008a): Coordinated nuclear receptor regulation of the efflux transporter, Mrp2, and the phase-II metabolizing enzyme, GSTpi, at the blood-brain barrier. *J Cereb Blood Flow Metab* 28, 1222-1234

BAUER, B., A. M. HARTZ u. D. S. MILLER (2007): Tumor necrosis factor alpha and endothelin-1 increase P-glycoprotein expression and transport activity at the blood-brain barrier. *Mol Pharmacol* 71, 667-675

BAUER, B., A. M. HARTZ, A. PEKCEC, K. TOELLNER, D. S. MILLER u. H. POTSCHKA (2008b): Seizure-induced up-regulation of P-glycoprotein at the blood-brain barrier through glutamate and cyclooxygenase-2 signaling. *Mol Pharmacol* 73, 1444-1453

BAUER, B., X. YANG, A. M. HARTZ, E. R. OLSON, R. ZHAO, J. C. KALVASS, G. M. POLLACK u. D. S. MILLER (2006): In vivo activation of human pregnane X receptor tightens the blood-brain barrier to methadone through P-glycoprotein up-regulation. *Mol Pharmacol* 70, 1212-1219

BAUER, J. u. S. SCHWALEN (2000): Topiramat (Topamax®) Pharmakologische Charakteristik und Stellenwert in der aktuellen Epilepsitherapie. *Der Nervenarzt* 71, 495-501

BEGLEY, D. J. (1996): The blood-brain barrier: principles for targeting peptides and drugs to the central nervous system. *J Pharm Pharmacol* 48, 136-146

BEGLEY, D. J. (2004): ABC transporters and the blood-brain barrier. *Curr Pharm Des* 10, 1295-1312

BERG, A. T., S. F. BERKOVIC, M. J. BRODIE, J. BUCHHALTER, J. H. CROSS, W. VAN EMDE BOAS, J. ENGEL, J. FRENCH, T. A. GLAUSER, G. W. MATHERN, S. L. MOSHE, D. NORDLI, P. PLOUIN u. I. E. SCHEFFER (2010): Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005-2009. *Epilepsia* 51, 676-685

BERG, A. T. u. I. E. SCHEFFER (2011): New concepts in classification of the epilepsies: entering the 21st century. *Epilepsia* 52, 1058-1062

BESSARABOVA, M., A. ISHKIN, L. JEBAILY, T. NIKOLSKAYA u. Y. NIKOLSKY (2012): Knowledge-based analysis of proteomics data. *BMC Bioinformatics* 13 Suppl 16, S13

- BHATIA, A., H.-J. SCHÄFER u. C. A. HRYCYNIA (2005): Oligomerization of the human ABC transporter ABCG2: evaluation of the native protein and chimeric dimers. *Biochemistry* 44, 10893-10904
- BORST, P., R. EVERS, M. KOOL u. J. WIJNHOLDS (2000): A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins. *J Natl Cancer Inst* 92, 1295-1302
- BRADFORD, M. M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* 72, 248-254
- BRAIMAN, A. u. N. ISAKOV (2015): The Role of Crk Adaptor Proteins in T-Cell Adhesion and Migration. *Front Immunol* 6, 509
- BRANDT, C., K. BETHMANN, A. M. GASTENS u. W. LOSCHER (2006): The multidrug transporter hypothesis of drug resistance in epilepsy: Proof-of-principle in a rat model of temporal lobe epilepsy. *Neurobiol Dis* 24, 202-211
- BRANDT, C., M. GLIEN, H. POTSCHKA, H. VOLK u. W. LOSCHER (2003): Epileptogenesis and neuropathology after different types of status epilepticus induced by prolonged electrical stimulation of the basolateral amygdala in rats. *Epilepsy research* 55, 83-103
- BRODIE, M., S. SHORVON, R. CANGER, P. HALASZ, S. JOHANNESSEN, P. THOMPSON, H. WIESER u. P. WOLF (1997): Commission on European Affairs: appropriate standards of epilepsy care across Europe. *Epilepsia* 38, 1245-1250
- BROOKS, P. C. (1996): Cell adhesion molecules in angiogenesis. *Cancer Metastasis Rev* 15, 187-194
- CERVENY, L., P. PAVEK, J. MALAKOVA, F. STAUD u. Z. FENDRICH (2006): Lack of interactions between breast cancer resistance protein (bcrp/abcg2) and selected antiepileptic agents. *Epilepsia* 47, 461-468
- CHANDLER, K. (2006): Canine epilepsy: what can we learn from human seizure disorders? *Veterinary journal* 172, 207-217
- CHOPP, M., Y. LI u. J. ZHANG (2008): Plasticity and remodeling of brain. *J Neurol Sci* 265, 97-101
- CHRISTIAN, S., J. PILCH, M. E. AKERMAN, K. PORKKA, P. LAAKKONEN u. E. RUOSLAHTI (2003): Nucleolin expressed at the cell surface is a marker of endothelial cells in angiogenic blood vessels. *J Cell Biol* 163, 871-878
- CISTERNINO, S., C. MERCIER, F. BOURASSET, F. ROUX u. J. M. SCHERRMANN (2004): Expression, up-regulation, and transport activity of the multidrug-resistance protein Abcg2 at the mouse blood-brain barrier. *Cancer research* 64, 3296-3301
- CLINCKERS, R., I. SMOLDERS, A. MEURS, G. EBINGER u. Y. MICHOTTE (2005): Quantitative in vivo microdialysis study on the influence of multidrug transporters on the blood-brain barrier passage of oxcarbazepine: concomitant use of hippocampal monoamines

as pharmacodynamic markers for the anticonvulsant activity. *J Pharmacol Exp Ther* 314, 725-731

COLLADO, B., I. GUTIERREZ-CANAS, N. RODRIGUEZ-HENCHE, J. C. PRIETO u. M. J. CARMENA (2004): Vasoactive intestinal peptide increases vascular endothelial growth factor expression and neuroendocrine differentiation in human prostate cancer LNCaP cells. *Regul Pept* 119, 69-75

CONTRERAS, M., T. SENGUPTA, F. SHEIKH, P. AUBOURG u. I. SINGH (1996): Topology of ATP-binding domain of adrenoleukodystrophy gene product in peroxisomes. *Archives of biochemistry and biophysics* 334, 369-379

COORAY, H. C., C. G. BLACKMORE, L. MASKELL u. M. A. BARRAND (2002): Localisation of breast cancer resistance protein in microvessel endothelium of human brain. *Neuroreport* 13, 2059-2063

CORDON-CARDO, C., J. P. O'BRIEN, D. CASALS, L. RITTMAN-GRAUER, J. L. BIEDLER, M. R. MELAMED u. J. R. BERTINO (1989): Multidrug-resistance gene (P-glycoprotein) is expressed by endothelial cells at blood-brain barrier sites. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 695-698

CORNEJO, B. J., M. H. MESCHES, S. COULTRAP, M. D. BROWNING u. T. A. BENKE (2007): A single episode of neonatal seizures permanently alters glutamatergic synapses. *Ann Neurol* 61, 411-426

COTE, M. C., J. R. LAVOIE, F. HOULE, A. POIRIER, S. ROUSSEAU u. J. HUOT (2010): Regulation of vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell migration by LIM kinase 1-mediated phosphorylation of annexin 1. *The Journal of biological chemistry* 285, 8013-8021

COUET, J., L. SHENGWEN, T. OKAMOTO, P. E. SCHERER u. M. P. LISANTI (1997): Molecular and cellular biology of caveolae paradoxes and plasticities. *Trends Cardiovasc Med* 7, 103-110

CREIGHTON, T. E. (1993): *Proteins: structures and molecular properties*. Macmillan, CRITCHLEY, D. R. (2009): Biochemical and structural properties of the integrin-associated cytoskeletal protein talin. *Annu Rev Biophys* 38, 235-254

CROWE, A. u. Y. K. TEOH (2006): Limited P-glycoprotein mediated efflux for anti-epileptic drugs. *Journal of drug targeting* 14, 291-300

CUCULLO, L., M. HOSSAIN, E. RAPP, T. MANDERS, N. MARCHI u. D. JANIGRO (2007): Development of a humanized in vitro blood-brain barrier model to screen for brain penetration of antiepileptic drugs. *Epilepsia* 48, 505-516

DALVI, S., N. ON, H. NGUYEN, M. POGORZELEC, D. W. MILLER u. G. M. HATCH (2014): The blood-brain barrier: regulation of fatty acid and drug transport. *Neurochemistry. InTech, Rijeka* 1-58

DARIUS, J., F. P. MEYER, B. A. SABEL u. U. SCHROEDER (2000): Influence of nanoparticles on the brain-to-serum distribution and the metabolism of valproic acid in mice.

J Pharm Pharmacol 52, 1043-1047

DAUCHY, S., F. DUTHEIL, R. J. WEAVER, F. CHASSOUX, C. DAUMAS-DUPORT, P. O. COURAUD, J. M. SCHERRMANN, I. DE WAZIERS u. X. DECLEVES (2008): ABC transporters, cytochromes P450 and their main transcription factors: expression at the human blood-brain barrier. *Journal of neurochemistry* 107, 1518-1528

DAVIS, T. P., L. SANCHEZ-COVARUBIAS u. M. E. TOME (2014): P-glycoprotein trafficking as a therapeutic target to optimize CNS drug delivery. *Advances in pharmacology* 71, 25-44

DE VRIES, S., I. S. NAARMANN-DE VRIES, H. URLAUB, H. LUE, J. BERNHAGEN, D. H. OSTARECK u. A. OSTARECK-LEDERER (2013): Identification of DEAD-box RNA helicase 6 (DDX6) as a cellular modulator of vascular endothelial growth factor expression under hypoxia. *Journal of biological chemistry* 288, 5815-5827

DEAN, M., Y. HAMON u. G. CHIMINI (2001a): The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *J Lipid Res* 42, 1007-1017

DEAN, M., A. RZHETSKY u. R. ALLIKMETS (2001b): The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Res* 11, 1156-1166

DEMEULE, M., A. REGINA, J. JODOIN, A. LAPLANTE, C. DAGENAIS, F. BERTHELET, A. MOGHRABI u. R. BELIVEAU (2002): Drug transport to the brain: key roles for the efflux pump P-glycoprotein in the blood-brain barrier. *Vascul Pharmacol* 38, 339-348

DESTOUCHES, D., D. EL KHOURY, Y. HAMMA-KOURBALI, B. KRUST, P. ALBANESE, P. KATSORIS, G. GUICHARD, J. P. BRIAND, J. COURTY u. A. G. HOVANESSIAN (2008): Suppression of tumor growth and angiogenesis by a specific antagonist of the cell-surface expressed nucleolin. *PloS one* 3, e2518

DEVINSKY, O., A. VEZZANI, S. NAJJAR, N. C. DE LANEROLLE u. M. A. ROGAWSKI (2013): Glia and epilepsy: excitability and inflammation. *Trends Neurosci* 36, 174-184

DI MASI, A., E. DE MARINIS, P. ASCENZI u. M. MARINO (2009): Nuclear receptors CAR and PXR: Molecular, functional, and biomedical aspects. *Mol Aspects Med* 30, 297-343

DING, Y., N. SONG, C. LIU, T. HE, W. ZHUO, X. HE, Y. CHEN, X. SONG, Y. FU u. Y. LUO (2012): Heat shock cognate 70 regulates the translocation and angiogenic function of nucleolin. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 32, e126-134

DOMBROWSKI, S. M., S. Y. DESAI, M. MARRONI, L. CUCULLO, K. GOODRICH, W. BINGAMAN, M. R. MAYBERG, L. BENGEZ u. D. JANIGRO (2001): Overexpression of multiple drug resistance genes in endothelial cells from patients with refractory epilepsy. *Epilepsia* 42, 1501-1506

DOUVILLE, P., M. F. SELDIN u. S. CARBONETTO (1992): Genetic mapping of the integrin alpha 1 gene (Vla1) to mouse chromosome 13. *Genomics* 14, 503-505

DOYLE, L. A., W. YANG, L. V. ABRUZZO, T. KROGMANN, Y. GAO, A. K. RISHI u. D.

D. ROSS (1998): A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 15665-15670

DREYER, R. (1965): Erfahrungen mit Tegretal. *Nervenarzt* 36, 442-445

DUDEK, F. E. u. T. P. SUTULA (2007): Epileptogenesis in the dentate gyrus: a critical perspective. *Progress in brain research* 163, 755-773

EBERHARD, D. A., M. D. BROWN u. S. R. VANDENBERG (1994): Alterations of annexin expression in pathological neuronal and glial reactions. Immunohistochemical localization of annexins I, II (p36 and p11 subunits), IV, and VI in the human hippocampus. *Am J Pathol* 145, 640-649

EISENBLATTER, T., S. HUWEL u. H. J. GALLA (2003): Characterisation of the brain multidrug resistance protein (BMDP/ABCG2/BCRP) expressed at the blood-brain barrier. *Brain Res* 971, 221-231

ENGEL, J., JR., A. PITKANEN, J. A. LOEB, F. E. DUDEK, E. H. BERTRAM, 3RD, A. J. COLE, S. L. MOSHE, S. WIEBE, F. E. JENSEN, I. MODY, A. NEHLIG u. A. VEZZANI (2013): Epilepsy biomarkers. *Epilepsia* 54 Suppl 4, 61-69

FAHRENKRUG, J. (1989): VIP and autonomic neurotransmission. *Pharmacol Ther* 41, 515-534

FELIX, R. A. u. M. A. BARRAND (2002): P-glycoprotein expression in rat brain endothelial cells: evidence for regulation by transient oxidative stress. *J Neurochem* 80, 64-72

FERNANDEZ, C., M. BUYSE, M. GERMAN-FATTAL u. F. GIMENEZ (2004): Influence of the pro-inflammatory cytokines on P-glycoprotein expression and functionality. *J Pharm Pharm Sci* 7, 359-371

FERRY, D. R., H. TRAUNECKER u. D. J. KERR (1996): Clinical trials of P-glycoprotein reversal in solid tumours. *Eur J Cancer* 32A, 1070-1081

FISCHER, A., K. JURINA, K. RENTMEISTER, A. TIPOLD u. T. VON KLOPMANN (2013): Die idiopathische Epilepsie des Hundes. Georg Thieme Verlag,

FISCHER, V., A. RODRIGUEZ-GASCON, F. HEITZ, R. TYNES, C. HAUCK, D. COHEN u. A. E. VICKERS (1998): The multidrug resistance modulator valspodar (PSC 833) is metabolized by human cytochrome P450 3A. Implications for drug-drug interactions and pharmacological activity of the main metabolite. *Drug Metab Dispos* 26, 802-811

FISHER, R. S., C. ACEVEDO, A. ARZIMANOGLU, A. BOGACZ, J. H. CROSS, C. E. ELGER, J. ENGEL, JR., L. FORSGREN, J. A. FRENCH, M. GLYNN, D. C. HESDORFFER, B. I. LEE, G. W. MATHERN, S. L. MOSHE, E. PERUCCA, I. E. SCHEFFER, T. TOMSON, M. WATANABE u. S. WIEBE (2014): ILAE Official Report: A practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia* 55, 475-482

FISHER, R. S., W. V. E. BOAS, W. BLUME, C. ELGER, P. GENTON, P. LEE u. J. ENGEL (2005): Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). *Epilepsia* 46, 470-472

- FOJO, A. T., K. UEDA, D. J. SLAMON, D. G. POPLACK, M. M. GOTTESMAN u. I. PASTAN (1987): Expression of a multidrug-resistance gene in human tumors and tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 265-269
- FOLDVARY, N., W. E. BINGAMAN u. E. WYLLIE (2001): Surgical treatment of epilepsy. *Neurol Clin* 19, 491-515
- FRÖSCHER, W., F. VASSELLA u. A. HUFNAGEL (2004): Die Epilepsien: Grundlagen, Klinik, Behandlung. Schattauer,
- FU, D. u. I. M. ARIAS (2012): Intracellular trafficking of P-glycoprotein. *The international journal of biochemistry & cell biology* 44, 461-464
- FU, D., E. M. VAN DAM, A. BRYMORA, I. G. DUGGIN, P. J. ROBINSON u. B. D. ROUFOGALIS (2007): The small GTPases Rab5 and RalA regulate intracellular traffic of P-glycoprotein. *Biochim Biophys Acta* 1773, 1062-1072
- GARBERG, P. (1998): In vitro models of the blood-brain barrier. *Altern Lab Anim* 26, 821-847
- GINGRICH, M. B. u. S. F. TRAYNELIS (2000): Serine proteases and brain damage - is there a link? *Trends Neurosci* 23, 399-407
- GOLDEN, P. L. u. G. M. POLLACK (2003): Blood-brain barrier efflux transport. *J Pharm Sci* 92, 1739-1753
- GOOZ, M. (2010): ADAM-17: the enzyme that does it all. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* 45, 146-169
- GÖÖZ, P., M. GÖÖZ, A. BALDYS u. S. HOFFMAN (2009): ADAM-17 regulates endothelial cell morphology, proliferation, and in vitro angiogenesis. *Biochemical and biophysical research communications* 380, 33-38
- GOZES, I., M. FRIDKIN, J. M. HILL u. D. E. BRENNEMAN (1999): Pharmaceutical VIP: prospects and problems. *Curr Med Chem* 6, 1019-1034
- GUERRINI, R. (2006): Epilepsy in children. *Lancet* 367, 499-524
- GUMBINER, B., T. LOWENKOPF u. D. APATIRA (1991): Identification of a 160-kDa polypeptide that binds to the tight junction protein ZO-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 88, 3460-3464
- HAEUSSLER, D. J., D. R. PIMENTEL, X. HOU, J. R. BURGOYNE, R. A. COHEN u. M. M. BACHSCHMID (2013): Endomembrane H-Ras controls vascular endothelial growth factor-induced nitric-oxide synthase-mediated endothelial cell migration. *The Journal of biological chemistry* 288, 15380-15389
- HAGEN, K. u. U. RIGTER (1964): Therapeutische Erfahrungen mit einem neuartigen Antiepilepticum bei Kindern und Jugendlichen. *Nervenarzt* 35, 312-314
- HARTZ, A. u. B. BAUER (2010): Regulation of ABC transporters at the blood-brain barrier:

new targets for CNS therapy. *Molecular interventions* 10, 293

HARTZ, A. M., B. BAUER, M. L. BLOCK, J. S. HONG u. D. S. MILLER (2008): Diesel exhaust particles induce oxidative stress, proinflammatory signaling, and P-glycoprotein up-regulation at the blood-brain barrier. *FASEB J* 22, 2723-2733

HARTZ, A. M., B. BAUER, G. FRICKER u. D. S. MILLER (2004): Rapid regulation of P-glycoprotein at the blood-brain barrier by endothelin-1. *Mol Pharmacol* 66, 387-394

HARTZ, A. M., B. BAUER, G. FRICKER u. D. S. MILLER (2006): Rapid modulation of P-glycoprotein-mediated transport at the blood-brain barrier by tumor necrosis factor- α and lipopolysaccharide. *Mol Pharmacol* 69, 462-470

HARTZ, A. M., E. K. MADOLE, D. S. MILLER u. B. BAUER (2010a): Estrogen receptor beta signaling through phosphatase and tensin homolog/phosphoinositide 3-kinase/Akt/glycogen synthase kinase 3 down-regulates blood-brain barrier breast cancer resistance protein. *J Pharmacol Exp Ther* 334, 467-476

HARTZ, A. M., A. MAHRINGER, D. S. MILLER u. B. BAUER (2010b): 17- β -Estradiol: a powerful modulator of blood-brain barrier BCRP activity. *J Cereb Blood Flow Metab* 30, 1742-1755

HASELOFF, R. F., I. E. BLASIG, H. C. BAUER u. H. BAUER (2005): In search of the astrocytic factor(s) modulating blood-brain barrier functions in brain capillary endothelial cells in vitro. *Cell Mol Neurobiol* 25, 25-39

HASELOFF, R. F., S. DITHMER, L. WINKLER, H. WOLBURG u. I. E. BLASIG (2015): Transmembrane proteins of the tight junctions at the blood-brain barrier: structural and functional aspects. In: *Seminars in cell & developmental biology*, 16-25

HAUCK, S. M., J. DIETTER, R. L. KRAMER, F. HOFMAIER, J. K. ZIPPLIES, B. AMANN, A. FEUCHTINGER, C. A. DEEG u. M. UEFFING (2010): Deciphering membrane-associated molecular processes in target tissue of autoimmune uveitis by label-free quantitative mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics* 9, 2292-2305

HAUCK, S. M., F. HOFMAIER, J. DIETTER, M. E. SWADZBA, M. BLINDERT, B. AMANN, J. BEHLER, E. KREMMER, M. UEFFING u. C. A. DEEG (2012): Label-free LC-MSMS analysis of vitreous from autoimmune uveitis reveals a significant decrease in secreted Wnt signalling inhibitors DKK3 and SFRP2. *J Proteomics* 75, 4545-4554

HAUPTMANN, A. (1912): Luminal bei epilepsie. *Munch Med Wochenschr* 59, 1907-1909

HELLSTEN, J., M. J. WEST, A. ARVIDSSON, J. EKSTRAND, L. JANSSON, M. WENNSTROM u. A. TINGSTROM (2005): Electroconvulsive seizures induce angiogenesis in adult rat hippocampus. *Biol Psychiatry* 58, 871-878

HERBST, R. S. (2004): Review of epidermal growth factor receptor biology. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 59, 21-26

HIRATA, K., T. ISHIDA, K. PENTA, M. REZAEI, E. YANG, J. WOHLGEMUTH u. T. QUERTERMOUS (2001): Cloning of an immunoglobulin family adhesion molecule

selectively expressed by endothelial cells. *The Journal of biological chemistry* 276, 16223-16231

HOFFMANN, K., A. M. GASTENS, H. A. VOLK u. W. LOSCHER (2006): Expression of the multidrug transporter MRP2 in the blood-brain barrier after pilocarpine-induced seizures in rats. *Epilepsy research* 69, 1-14

HOLMES, D. I. u. I. C. ZACHARY (2008): Vascular endothelial growth factor regulates stanniocalcin-1 expression via neuropilin-1-dependent regulation of KDR and synergism with fibroblast growth factor-2. *Cell Signal* 20, 569-579

HOLMES, K., O. L. ROBERTS, A. M. THOMAS u. M. J. CROSS (2007): Vascular endothelial growth factor receptor-2: structure, function, intracellular signalling and therapeutic inhibition. *Cell Signal* 19, 2003-2012

HOLTKAMP, M. u. H. MEIERKORD (2007): Anticonvulsant, antiepileptogenic, and antiictogenic pharmacostategies. *Cell Mol Life Sci* 64, 2023-2041

HONG, H., Y. LU, Z. N. JI u. G. Q. LIU (2006): Up-regulation of P-glycoprotein expression by glutathione depletion-induced oxidative stress in rat brain microvessel endothelial cells. *J Neurochem* 98, 1465-1473

HONG, K. S., Y. J. CHO, S. K. LEE, S. W. JEONG, W. K. KIM u. E. J. OH (2004): Diffusion changes suggesting predominant vasogenic oedema during partial status epilepticus. *Seizure* 13, 317-321

HUANG, Y., H. SHI, H. ZHOU, X. SONG, S. YUAN u. Y. LUO (2006): The angiogenic function of nucleolin is mediated by vascular endothelial growth factor and nonmuscle myosin. *Blood* 107, 3564-3571

HUSSEMAN, J. W., D. NOCHLIN u. I. VINCENT (2000): Mitotic activation: a convergent mechanism for a cohort of neurodegenerative diseases. *Neurobiology of aging* 21, 815-828

INDER, K. L., Y. Z. ZHENG, M. J. DAVIS, H. MOON, D. LOO, H. NGUYEN, J. A. CLEMENTS, R. G. PARTON, L. J. FOSTER u. M. M. HILL (2012): Expression of PTRF in PC-3 Cells modulates cholesterol dynamics and the actin cytoskeleton impacting secretion pathways. *Mol Cell Proteomics* 11, M111 012245

INTERNATIONAL HUMAN GENOME SEQUENCING, C. (2004): Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* 431, 931-945

ITO, S. u. H. OGUNI (2011): Ketogenic diet for intractable childhood epilepsy; as an early option as well as a last resort. *Brain Nerve* 63, 393-400

IVENS, S., S. GABRIEL, G. GREENBERG, A. FRIEDMAN u. I. SHELEF (2010): Blood-brain barrier breakdown as a novel mechanism underlying cerebral hyperperfusion syndrome. *J Neurol* 257, 615-620

IVENS, S., D. KAUFER, L. P. FLORES, I. BECHMANN, D. ZUMSTEG, O. TOMKINS, E. SEIFFERT, U. HEINEMANN u. A. FRIEDMAN (2007): TGF-beta receptor-mediated albumin uptake into astrocytes is involved in neocortical epileptogenesis. *Brain* 130, 535-547

- JAHNKE, K., D. F. KRAEMER, K. R. KNIGHT, D. FORTIN, S. BELL, N. D. DOOLITTLE, L. L. MULDOON u. E. A. NEUWELT (2008): Intraarterial chemotherapy and osmotic blood-brain barrier disruption for patients with embryonal and germ cell tumors of the central nervous system. *Cancer* 112, 581-588
- JANIGRO, D. (1999): Blood-brain barrier, ion homeostasis and epilepsy: possible implications towards the understanding of ketogenic diet mechanisms. *Epilepsy research* 37, 223-232
- JANZER, R. C. u. M. C. RAFF (1987): Astrocytes induce blood-brain barrier properties in endothelial cells. *Nature* 325, 253-257
- JENSEN, F. E. (2009): Introduction. Posttraumatic epilepsy: treatable epileptogenesis. *Epilepsia* 50 Suppl 2, 1-3
- JIN, Y., Y. LIU, Q. LIN, J. LI, J. E. DRUSO, M. A. ANTONYAK, C. J. MEININGER, S. L. ZHANG, D. E. DOSTAL u. J.-L. GUAN (2013a): Deletion of Cdc42 enhances ADAM17-mediated vascular endothelial growth factor receptor 2 shedding and impairs vascular endothelial cell survival and vasculogenesis. *Molecular and cellular biology* 33, 4181-4197
- JIN, Y., Y. LIU, Q. LIN, J. LI, J. E. DRUSO, M. A. ANTONYAK, C. J. MEININGER, S. L. ZHANG, D. E. DOSTAL, J. L. GUAN, R. A. CERIONE u. X. PENG (2013b): Deletion of Cdc42 enhances ADAM17-mediated vascular endothelial growth factor receptor 2 shedding and impairs vascular endothelial cell survival and vasculogenesis. *Mol Cell Biol* 33, 4181-4197
- JONGMANS, J. (1964): Report on the Anti-Epileptic Action of Tegretol. *Epilepsia* 5, 74-82
- JOO, F. (1985): The blood-brain barrier in vitro: Ten years of research on microvessels isolated from the brain. *Neurochem Int* 7, 1-25
- JOPLING, H. M., A. F. ODELL, N. M. HOOPER, I. C. ZACHARY, J. H. WALKER u. S. PONNAMBALAM (2009a): Rab GTPase regulation of VEGFR2 trafficking and signaling in endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29, 1119-1124
- JOPLING, H. M., A. F. ODELL, N. M. HOOPER, I. C. ZACHARY, J. H. WALKER u. S. PONNAMBALAM (2009b): Rab GTPase regulation of VEGFR2 trafficking and signaling in endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29, 1119-1124
- JULIANO, R. L. u. V. LING (1976): A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim Biophys Acta* 455, 152-162
- KAGE, K., S. TSUKAHARA, T. SUGIYAMA, S. ASADA, E. ISHIKAWA, T. TSURUO u. Y. SUGIMOTO (2002): Dominant-negative inhibition of breast cancer resistance protein as drug efflux pump through the inhibition of S-S dependent homodimerization. *Int J Cancer* 97, 626-630
- KAIPAINEN, A., J. KORHONEN, T. MUSTONEN, V. W. VAN HINSBERGH, G. H. FANG, D. DUMONT, M. BREITMAN u. K. ALITALO (1995): Expression of the fms-like tyrosine kinase 4 gene becomes restricted to lymphatic endothelium during development. *Proc*

Natl Acad Sci U S A 92, 3566-3570

KANO, T., S. WADA, K. MORIMOTO, Y. KATO u. T. OGIHARA (2011): Effect of knockdown of ezrin, radixin, and moesin on P-glycoprotein function in HepG2 cells. *J Pharm Sci* 100, 5308-5314

KAWASE, A., M. SAKATA, N. YADA, M. NAKASAKA, T. SHIMIZU, Y. KATO u. M. IWAKI (2014): Decreased radixin function for ATP-binding cassette transporters in liver in adjuvant-induced arthritis rats. *J Pharm Sci* 103, 4058-4065

KEPPLER, D. (2011): Multidrug resistance proteins (MRPs, ABCs): importance for pathophysiology and drug therapy. *Handb Exp Pharmacol* 299-323

KEY, M. (2012): A tutorial in displaying mass spectrometry-based proteomic data using heat maps. *BMC Bioinformatics* 13, S10

KIKUCHI, S., M. HATA, K. FUKUMOTO, Y. YAMANE, T. MATSUI, A. TAMURA, S. YONEMURA, H. YAMAGISHI, D. KEPPLER, S. TSUKITA u. S. TSUKITA (2002): Radixin deficiency causes conjugated hyperbilirubinemia with loss of Mrp2 from bile canalicular membranes. *Nat Genet* 31, 320-325

KIM, S. Y., M. BUCKWALTER, H. SOREQ, A. VEZZANI u. D. KAUFER (2012): Blood-brain barrier dysfunction-induced inflammatory signaling in brain pathology and epileptogenesis. *Epilepsia* 53 Suppl 6, 37-44

KLIEWER, S. A., B. GOODWIN u. T. M. WILLSON (2002): The nuclear pregnane X receptor: a key regulator of xenobiotic metabolism. *Endocr Rev* 23, 687-702

KODAIRA, H., H. KUSUHARA, J. USHIKI, E. FUSE u. Y. SUGIYAMA (2010): Kinetic analysis of the cooperation of P-glycoprotein (P-gp/Abcb1) and breast cancer resistance protein (Bcrp/Abcg2) in limiting the brain and testis penetration of erlotinib, flavopiridol, and mitoxantrone. *J Pharmacol Exp Ther* 333, 788-796

KOUTSIOUMPA, M., G. DROSOU, C. MIKELIS, K. THEOCHARI, D. VOURTSIS, P. KATSORIS, E. GIANNOPOULOU, J. COURTY, C. PETROU, V. MAGAFA, P. CORDOPATIS u. E. PAPADIMITRIOU (2012): Pleiotrophin expression and role in physiological angiogenesis in vivo: potential involvement of nucleolin. *Vasc Cell* 4, 4

KRÄMER, G. (2012): Lexikon der Epileptologie. Hippocampus-Verlag,

KREUTER, J. (2001): Nanoparticulate systems for brain delivery of drugs. *Adv Drug Deliv Rev* 47, 65-81

KRISHNA, R. u. L. D. MAYER (2000): Multidrug resistance (MDR) in cancer. Mechanisms, reversal using modulators of MDR and the role of MDR modulators in influencing the pharmacokinetics of anticancer drugs. *Eur J Pharm Sci* 11, 265-283

KUBOTA, H., H. ISHIHARA, T. LANGMANN, G. SCHMITZ, B. STIEGER, H. G. WIESER, Y. YONEKAWA u. K. FREI (2006): Distribution and functional activity of P-glycoprotein and multidrug resistance-associated proteins in human brain microvascular endothelial cells in hippocampal sclerosis. *Epilepsy research* 68, 213-228

- KUHNLE, M., M. EGGER, C. MULLER, A. MAHRINGER, G. BERNHARDT, G. FRICKER, B. KONIG u. A. BUSCHAUER (2009): Potent and selective inhibitors of breast cancer resistance protein (ABCG2) derived from the p-glycoprotein (ABCB1) modulator tariquidar. *J Med Chem* 52, 1190-1197
- KWAN, P., A. ARZIMANOGLU, A. T. BERG, M. J. BRODIE, W. ALLEN HAUSER, G. MATHERN, S. L. MOSHÉ, E. PERUCCA, S. WIEBE u. J. FRENCH (2010): Definition of drug resistant epilepsy: consensus proposal by the ad hoc Task Force of the ILAE Commission on Therapeutic Strategies. *Epilepsia* 51, 1069-1077
- KWAN, P. u. M. J. BRODIE (2000): Early identification of refractory epilepsy. *N Engl J Med* 342, 314-319
- KWAN, P. u. M. J. BRODIE (2002): Refractory epilepsy: a progressive, intractable but preventable condition? *Seizure* 11, 77-84
- KWAN, P. u. M. J. BRODIE (2004): Phenobarbital for the treatment of epilepsy in the 21st century: a critical review. *Epilepsia* 45, 1141-1149
- KWAN, P. u. M. J. BRODIE (2006): Refractory epilepsy: mechanisms and solutions. *Expert Rev Neurother* 6, 397-406
- KWAN, P., W. S. POON, H. K. NG, D. E. KANG, V. WONG, P. W. NG, C. H. LUI, N. C. SIN, K. S. WONG u. L. BAUM (2008): Multidrug resistance in epilepsy and polymorphisms in the voltage-gated sodium channel genes SCN1A, SCN2A, and SCN3A: correlation among phenotype, genotype, and mRNA expression. *Pharmacogenet Genomics* 18, 989-998
- KWAN, P. u. J. W. SANDER (2004): The natural history of epilepsy: an epidemiological view. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 75, 1376-1381
- KWAN, P., S. C. SCHACHTER u. M. J. BRODIE (2011): Drug-resistant epilepsy. *N Engl J Med* 365, 919-926
- LAI, C. H. u. K. H. KUO (2005): The critical component to establish in vitro BBB model: Pericyte. *Brain Res Brain Res Rev* 50, 258-265
- LANSBERG, M. G., M. W. O'BRIEN, A. M. NORBASH, M. E. MOSELEY, M. MORRELL u. G. W. ALBERS (1999): MRI abnormalities associated with partial status epilepticus. *Neurology* 52, 1021-1027
- LAPINSKI, P. E., S. KWON, B. A. LUBECK, J. E. WILKINSON, R. S. SRINIVASAN, E. SEVICK-MURACA u. P. D. KING (2012): RASA1 maintains the lymphatic vasculature in a quiescent functional state in mice. *J Clin Invest* 122, 733-747
- LAWN, N. D., W. R. BAMLET, K. RADHAKRISHNAN, P. C. O'BRIEN u. E. L. SO (2004): Injuries due to seizures in persons with epilepsy: a population-based study. *Neurology* 63, 1565-1570
- LAZAROWSKI, A., F. LUBIENIECKI, S. CAMARERO, H. POMATA, M. BARTULUCHI, G. SEVLEVER u. A. L. TARATUTO (2004): Multidrug resistance proteins in tuberous sclerosis and refractory epilepsy. *Pediatr Neurol* 30, 102-106

- LECHARDEUR, D., B. SCHWARTZ, D. PAULIN u. D. SCHERMAN (1995): Induction of blood-brain barrier differentiation in a rat brain-derived endothelial cell line. *Exp Cell Res* 220, 161-170
- LEE, S. H., W. CHUN, P. J. KONG, J. A. HAN, B. P. CHO, O. Y. KWON, H. J. LEE u. S. S. KIM (2006): Sustained activation of Akt by melatonin contributes to the protection against kainic acid-induced neuronal death in hippocampus. *J Pineal Res* 40, 79-85
- LEMMEN, J., I. E. TOZAKIDIS u. H. J. GALLA (2013a): Pregnane X receptor upregulates ABC-transporter Abcg2 and Abcb1 at the blood-brain barrier. *Brain Res* 1491, 1-13
- LEMMEN, J., I. E. P. TOZAKIDIS, P. BELE u. H.-J. GALLA (2013b): Constitutive androstane receptor upregulates Abcb1 and Abcg2 at the blood-brain barrier after CITCO activation. *Brain Research* 1501, 68-80
- LEPPIK, I. E. (1992): Intractable epilepsy in adults. *Epilepsy Res Suppl* 5, 7-11
- LERNER-NATOLI, M., F. DE BOCK, J. BOCKAERT u. G. RONDOUIN (1994): NADPH diaphorase-positive cells in the brain after status epilepticus. *Neuroreport* 5, 2633-2637
- LIBRIZZI, L., F. NOE, A. VEZZANI, M. DE CURTIS u. T. RAVIZZA (2012): Seizure-induced brain-borne inflammation sustains seizure recurrence and blood-brain barrier damage. *Ann Neurol* 72, 82-90
- LING, Q., A. T. JACOVINA, A. DEORA, M. FEBBRAIO, R. SIMANTOV, R. L. SILVERSTEIN, B. HEMPSTEAD, W. H. MARK u. K. A. HAJJAR (2004): Annexin II regulates fibrin homeostasis and neoangiogenesis in vivo. *J Clin Invest* 113, 38-48
- LITMAN, T., U. JENSEN, A. HANSEN, K. M. COVITZ, Z. ZHAN, P. FETSCH, A. ABATI, P. R. HANSEN, T. HORN, T. SKOVSGAARD u. S. E. BATES (2002): Use of peptide antibodies to probe for the mitoxantrone resistance-associated protein MXR/BCRP/ABCP/ABCG2. *Biochim Biophys Acta* 1565, 6-16
- LIU, J., B. RAZANI, S. TANG, B. I. TERMAN, J. A. WARE u. M. P. LISANTI (1999): Angiogenesis activators and inhibitors differentially regulate caveolin-1 expression and caveolae formation in vascular endothelial cells. Angiogenesis inhibitors block vascular endothelial growth factor-induced down-regulation of caveolin-1. *The Journal of biological chemistry* 274, 15781-15785
- LIU, N., S. HAN, P. H. LU u. X. M. XU (2004a): Upregulation of annexins I, II, and V after traumatic spinal cord injury in adult rats. *J Neurosci Res* 77, 391-401
- LIU, N. K., Y. P. ZHANG, S. HAN, J. PEI, L. Y. XU, P. H. LU, C. B. SHIELDS u. X. M. XU (2007a): Annexin A1 reduces inflammatory reaction and tissue damage through inhibition of phospholipase A2 activation in adult rats following spinal cord injury. *J Neuropathol Exp Neurol* 66, 932-943
- LIU, X., M. TU, R. S. KELLY, C. CHEN u. B. J. SMITH (2004b): Development of a computational approach to predict blood-brain barrier permeability. *Drug Metab Dispos* 32, 132-139

- LIU, X., Z. YANG, J. YANG u. H. YANG (2007b): Increased P-glycoprotein expression and decreased phenobarbital distribution in the brain of pentylenetetrazole-kindled rats. *Neuropharmacology* 53, 657-663
- LOMBARDO, L., R. PELLITTERI, M. BALAZY u. V. CARDILE (2008): Induction of nuclear receptors and drug resistance in the brain microvascular endothelial cells treated with antiepileptic drugs. *Curr Neurovasc Res* 5, 82-92
- LOSCHER, W. (2003): Pharmacological basis of the treatment of epilepsy in dogs and cats. *PRAKTISCHE TIERARZT-HANNOVER*- 84, 574-587
- LÖSCHER, W. (2005): Mechanisms of drug resistance. *Epileptic Disord* 7 Suppl 1, S3-9
- LÖSCHER, W. u. O. LANGER (2010): Imaging of P-glycoprotein function and expression to elucidate mechanisms of pharmacoresistance in epilepsy. *Curr Top Med Chem* 10, 1785-1791
- LÖSCHER, W. u. H. POTSCHKA (2002): Role of multidrug transporters in pharmacoresistance to antiepileptic drugs. *J Pharmacol Exp Ther* 301, 7-14
- LÖSCHER, W. u. H. POTSCHKA (2005a): Blood-brain barrier active efflux transporters: ATP-binding cassette gene family. *NeuroRx* 2, 86-98
- LÖSCHER, W. u. H. POTSCHKA (2005b): Drug resistance in brain diseases and the role of drug efflux transporters. *Nature Reviews Neuroscience* 6, 591-602
- LÖSCHER, W. u. H. POTSCHKA (2005c): Role of drug efflux transporters in the brain for drug disposition and treatment of brain diseases. *Prog Neurobiol* 76, 22-76
- LÖSCHER, W. u. D. SCHMIDT (2002): New horizons in the development of antiepileptic drugs. *Epilepsy research* 50, 3-16
- LÖSCHER, W. u. D. SCHMIDT (2011): Modern antiepileptic drug development has failed to deliver: ways out of the current dilemma. *Epilepsia* 52, 657-678
- LÖSCHER, W., F. R. UNGEMACH u. R. KROKER (2006): *Pharmakotherapie bei Haus- und Nutztieren*. Georg Thieme Verlag,
- LOUP, F., F. PICARD, Y. YONEKAWA, H. G. WIESER u. J. M. FRITSCHY (2009): Selective changes in GABAA receptor subtypes in white matter neurons of patients with focal epilepsy. *Brain* 132, 2449-2463
- LOUVEAU, A., I. SMIRNOV, T. J. KEYES, J. D. ECCLES, S. J. ROUHANI, J. D. PESKE, N. C. DERECKI, D. CASTLE, J. W. MANDELL, K. S. LEE, T. H. HARRIS u. J. KIPNIS (2015): Structural and functional features of central nervous system lymphatic vessels. *Nature* 523, 337-341
- LUKASIUK, K. u. A. J. BECKER (2014): Molecular biomarkers of epileptogenesis. *Neurotherapeutics* 11, 319-323
- LUNA-MUNGUÍA, H., J. D. SALVAMOSER, B. PASCHER, T. PIEPER, T. GETZINGER, M. KUDERNATSCH, G. KLUGER u. H. POTSCHKA (2015): Glutamate-mediated

upregulation of the multidrug resistance protein 2 in porcine and human brain capillaries. *J Pharmacol Exp Ther* 352, 368-378

LUNA-TORTOS, C., M. FEDROWITZ u. W. LOSCHER (2008): Several major antiepileptic drugs are substrates for human P-glycoprotein. *Neuropharmacology* 55, 1364-1375

LUNA-TORTOS, C., M. FEDROWITZ u. W. LOSCHER (2010): Evaluation of transport of common antiepileptic drugs by human multidrug resistance-associated proteins (MRP1, 2 and 5) that are overexpressed in pharmacoresistant epilepsy. *Neuropharmacology* 58, 1019-1032

LUNA-TORTOS, C., B. RAMBECK, U. H. JURGENS u. W. LOSCHER (2009): The antiepileptic drug topiramate is a substrate for human P-glycoprotein but not multidrug resistance proteins. *Pharm Res* 26, 2464-2470

MAGISTRETTI, P. J., M. M. DIETL, P. R. HOF, J. L. MARTIN, J. M. PALACIOS, N. SCHAAD u. M. SCHORDERET (1988): Vasoactive intestinal peptide as a mediator of intercellular communication in the cerebral cortex. Release, receptors, actions, and interactions with norepinephrine. *Annals of the New York Academy of Sciences* 527, 110-129

MAHAR DOAN, K. M., J. E. HUMPHREYS, L. O. WEBSTER, S. A. WRING, L. J. SHAMPINE, C. J. SERABJIT-SINGH, K. K. ADKISON u. J. W. POLLI (2002): Passive permeability and P-glycoprotein-mediated efflux differentiate central nervous system (CNS) and non-CNS marketed drugs. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 303, 1029-1037

MAHRINGER, A. u. G. FRICKER (2010): BCRP at the blood-brain barrier: genomic regulation by 17beta-estradiol. *Mol Pharm* 7, 1835-1847

MAINES, L. W., D. A. ANTONETTI, E. B. WOLPERT u. C. D. SMITH (2005): Evaluation of the role of P-glycoprotein in the uptake of paroxetine, clozapine, phenytoin and carbamazepine by bovine retinal endothelial cells. *Neuropharmacology* 49, 610-617

MAITRA, R., P. A. HALPIN, K. H. KARLSON, R. L. PAGE, D. Y. PAIK, M. O. LEAVITT, B. D. MOYER, B. A. STANTON u. J. W. HAMILTON (2001): Differential effects of mitomycin C and doxorubicin on P-glycoprotein expression. *Biochem J* 355, 617-624

MALIEPAARD, M., G. L. SCHEFFER, I. F. FANEYTE, M. A. VAN GASTELN, A. C. PIJNENBORG, A. H. SCHINKEL, M. J. VAN DE VIJVER, R. J. SCHEPER u. J. H. SCHELLENS (2001): Subcellular localization and distribution of the breast cancer resistance protein transporter in normal human tissues. *Cancer research* 61, 3458-3464

MARCHI, N., L. ANGELOV, T. MASARYK, V. FAZIO, T. GRANATA, N. HERNANDEZ, K. HALLENE, T. DIGLAW, L. FRANIC, I. NAJM u. D. JANIGRO (2007): Seizure-promoting effect of blood-brain barrier disruption. *Epilepsia* 48, 732-742

MARCHI, N., G. GUIZO, M. RIZZI, S. PIRKER, K. NOVAK, T. CZECH, C. BAUMGARTNER, D. JANIGRO, S. CACCIA u. A. VEZZANI (2005): A pilot study on brain-to-plasma partition of 10,11-dihydro-10-hydroxy-5H-dibenzo(b,f)azepine-5-carboxamide and MDR1 brain expression in epilepsy patients not responding to oxcarbazepine. *Epilepsia* 46, 1613-1619

MARCHI, N. u. M. LERNER-NATOLI (2013): Cerebrovascular remodeling and epilepsy. *The Neuroscientist* 19, 304-312

MARTIN-PADURA, I., S. LOSTAGLIO, M. SCHNEEMANN, L. WILLIAMS, M. ROMANO, P. FRUSCELLA, C. PANZERI, A. STOPPACCIARO, L. RUCO, A. VILLA, D. SIMMONS u. E. DEJANA (1998): Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration. *J Cell Biol* 142, 117-127

MAY, A., S. EVERS, A. STRAUBE, V. PFAFFENRATH, H. C. DIENER u. K. DEUTSCHEN MIGRANE- UND (2005): Treatment and prophylaxis for cluster headaches and other trigeminal autonomic headaches. Revised recommendations of the German Migraine and Headache Society. *Schmerz* 19, 225-241

MCCAFFREY, G., W. D. STAATZ, L. SANCHEZ-COVARRUBIAS, J. D. FINCH, K. DEMARCO, M. L. LARACUENTE, P. T. RONALDSON u. T. P. DAVIS (2012): P-glycoprotein trafficking at the blood-brain barrier altered by peripheral inflammatory hyperalgesia. *Journal of neurochemistry* 122, 962-975

MCCAGH, J., J. E. FISK u. G. A. BAKER (2009): Epilepsy, psychosocial and cognitive functioning. *Epilepsy research* 86, 1-14

MCCLOSKEY, D. P., S. D. CROLL u. H. E. SCHARFMAN (2005): Depression of synaptic transmission by vascular endothelial growth factor in adult rat hippocampus and evidence for increased efficacy after chronic seizures. *J Neurosci* 25, 8889-8897

MCDEVITT, C. A., R. F. COLLINS, M. CONWAY, S. MODOK, J. STORM, I. D. KERR, R. C. FORD u. R. CALLAGHAN (2006): Purification and 3D structural analysis of oligomeric human multidrug transporter ABCG2. *Structure* 14, 1623-1632

MCNAMARA, J. O., Y. Z. HUANG u. A. S. LEONARD (2006): Molecular signaling mechanisms underlying epileptogenesis. *Sci STKE* 2006, re12

MCNEIL, A. K., U. RESCHER, V. GERKE u. P. L. MCNEIL (2006): Requirement for annexin A1 in plasma membrane repair. *The Journal of biological chemistry* 281, 35202-35207

MEALEY, K. L., S. A. BENTJEN, J. M. GAY u. G. H. CANTOR (2001): Ivermectin sensitivity in collies is associated with a deletion mutation of the *mdr1* gene. *Pharmacogenetics and Genomics* 11, 727-733

MILLER, D. S. (2010): Regulation of P-glycoprotein and other ABC drug transporters at the blood-brain barrier. *Trends Pharmacol Sci* 31, 246-254

MILLER, D. S., B. BAUER u. A. M. HARTZ (2008): Modulation of P-glycoprotein at the blood-brain barrier: opportunities to improve central nervous system pharmacotherapy. *Pharmacol Rev* 60, 196-209

MO, W., J.-Y. LIU, J. ZHANG, S. PESTKA, Y. SHI u. X. LIU (2012): Biochemistry and pharmacology of human ABCC1/MRP1 and its role in detoxification and in multidrug

resistance of cancer chemotherapy. Recent advances in cancer research and therapy. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands 371-404

MOHANRAJ, R., J. NORRIE, L. J. STEPHEN, K. KELLY, N. HITIRIS u. M. J. BRODIE (2006): Mortality in adults with newly diagnosed and chronic epilepsy: a retrospective comparative study. *The Lancet. Neurology* 5, 481-487

MONKLEY, S. J., V. KOSTOUROU, L. SPENCE, B. PETRICH, S. COLEMAN, M. H. GINSBERG, C. A. PRITCHARD u. D. R. CRITCHLEY (2011): Endothelial cell talin1 is essential for embryonic angiogenesis. *Developmental biology* 349, 494-502

MOON, H., C. S. LEE, K. L. INDER, S. SHARMA, E. CHOI, D. M. BLACK, K. A. LE CAO, C. WINTERFORD, J. I. COWARD, M. T. LING, B. AUSTRALIAN PROSTATE CANCER, D. J. CRAIK, R. G. PARTON, P. J. RUSSELL u. M. M. HILL (2014): PTRF/cavin-1 neutralizes non-caveolar caveolin-1 microdomains in prostate cancer. *Oncogene* 33, 3561-3570

MOORE, L. B., J. M. MAGLICH, D. D. MCKEE, B. WISELY, T. M. WILLSON, S. A. KLIEWER, M. H. LAMBERT u. J. T. MOORE (2002): Pregnane X receptor (PXR), constitutive androstane receptor (CAR), and benzoate X receptor (BXR) define three pharmacologically distinct classes of nuclear receptors. *Mol Endocrinol* 16, 977-986

MOOS, T. u. E. H. MORGAN (2001): Restricted transport of anti-transferrin receptor antibody (OX26) through the blood-brain barrier in the rat. *Journal of neurochemistry* 79, 119-129

MORGAN, R., C. W. KREIPKE, G. ROBERTS, M. BAGCHI u. J. A. RAFOLS (2007): Neovascularization following traumatic brain injury: possible evidence for both angiogenesis and vasculogenesis. *Neurol Res* 29, 375-381

MORIN-BRUREAU, M., A. LEBRUN, M. C. ROUSSET, L. FAGNI, J. BOCKAERT, F. DE BOCK u. M. LERNER-NATOLI (2011): Epileptiform activity induces vascular remodeling and zonula occludens 1 downregulation in organotypic hippocampal cultures: role of VEGF signaling pathways. *J Neurosci* 31, 10677-10688

MORIN-BRUREAU, M., V. RIGAU u. M. LERNER-NATOLI (2012): Why and how to target angiogenesis in focal epilepsies. *Epilepsia* 53, 64-68

MÜLLER, H. (1963): Ein neuartiges Antiepilepticum bei chronisch anstaltsbedürftigen Epileptikern. *Nervenarzt* 34, 463-464

NAG, S., J. L. MANIAS u. D. J. STEWART (2009): Expression of endothelial phosphorylated caveolin-1 is increased in brain injury. *Neuropathol Appl Neurobiol* 35, 417-426

NAG, S., R. VENUGOPALAN u. D. J. STEWART (2007): Increased caveolin-1 expression precedes decreased expression of occludin and claudin-5 during blood-brain barrier breakdown. *Acta Neuropathol* 114, 459-469

NAKANISHI, H., A. YONEZAWA, K. MATSUBARA u. I. YANO (2013): Impact of P-glycoprotein and breast cancer resistance protein on the brain distribution of antiepileptic

drugs in knockout mouse models. *Eur J Pharmacol* 710, 20-28

NAKANO, T., S. SEKINE, K. ITO u. T. HORIE (2013): Ezrin regulates the expression of Mrp2/Abcc2 and Mdr1/Abcb1 along the rat small intestinal tract. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 305, G807-817

NANNELLI, A., F. ROSSIGNOLO, R. TOLANDO, P. ROSSATO, M. PELLEGGATTI, V. LONGO u. P. G. GERVASI (2010): Expression and distribution of CYP3A genes, CYP2B22, and MDR1, MRP1, MRP2, LRP efflux transporters in brain of control and rifampicin-treated pigs. *Mol Cell Biochem* 337, 133-143

NASSAR, Z. D., H. MOON, T. DUONG, L. NEO, M. M. HILL, M. FRANCOIS, R. G. PARTON u. M. O. PARAT (2013): PTRF/Cavin-1 decreases prostate cancer angiogenesis and lymphangiogenesis. *Oncotarget* 4, 1844-1855

NDODE-EKANE, X. E., N. HAYWARD, O. GROHN u. A. PITKANEN (2010): Vascular changes in epilepsy: functional consequences and association with network plasticity in pilocarpine-induced experimental epilepsy. *Neuroscience* 166, 312-332

NELSON, O. L., E. CARSTEN, S. A. BENTJEN u. K. L. MEALEY (2003): Ivermectin toxicity in an Australian Shepherd dog with the MDR1 mutation associated with ivermectin sensitivity in Collies. *J Vet Intern Med* 17, 354-356

NEWTON, S. S., E. F. COLLIER, A. H. BENNETT, D. S. RUSSELL u. R. S. DUMAN (2004): Regulation of growth factor receptor bound 2 by electroconvulsive seizure. *Brain Res Mol Brain Res* 129, 185-188

NICOLAZZO, J. A. u. K. KATNENI (2009): Drug transport across the blood-brain barrier and the impact of breast cancer resistance protein (ABCG2). *Curr Top Med Chem* 9, 130-147

NICOLETTI, J. N., S. K. SHAH, D. P. MCCLOSKEY, J. H. GOODMAN, A. ELKADY, H. ATASSI, D. HYLTON, J. S. RUDGE, H. E. SCHARFMAN u. S. D. CROLL (2008): Vascular endothelial growth factor is up-regulated after status epilepticus and protects against seizure-induced neuronal loss in hippocampus. *Neuroscience* 151, 232-241

NINGARAJ, N., D. KHAITAN u. U. SANKPAL (2009): Role of KCNMA1 in Breast Cancer Metastasis and Angiogenesis. *Cancer research* 69, 6165-6165

NOACK, A., S. NOACK, A. HOFFMANN, K. MAALOUF, M. BUETTNER, P.-O. COURAUD, I. A. ROMERO, B. WEKSLER, D. ALMS u. K. RÖMERMANN (2014): Drug-induced trafficking of p-glycoprotein in human brain capillary endothelial cells as demonstrated by exposure to mitomycin C.

NOVICK, P. u. M. ZERIAL (1997): The diversity of Rab proteins in vesicle transport. *Current opinion in cell biology* 9, 496-504

NUSSDORFER, G. G. u. L. K. MALENDOWICZ (1998): Role of VIP, PACAP, and related peptides in the regulation of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Peptides* 19, 1443-1467

NWAOZUZU, O. M., L. A. SELLERS u. M. A. BARRAND (2003): Signalling pathways influencing basal and H₂O₂-induced P-glycoprotein expression in endothelial cells derived from the blood-brain barrier. *Journal of neurochemistry* 87, 1043-1051

OBY, E. u. D. JANIGRO (2006): The blood-brain barrier and epilepsy. *Epilepsia* 47, 1761-1774

OTROCK, Z. K., R. A. MAHFOUZ, J. A. MAKAREM u. A. I. SHAMSEDDINE (2007): Understanding the biology of angiogenesis: review of the most important molecular mechanisms. *Blood Cells, Molecules, and Diseases* 39, 212-220

OTT, M., G. FRICKER u. B. BAUER (2009): Pregnane X receptor (PXR) regulates P-glycoprotein at the blood-brain barrier: functional similarities between pig and human PXR. *J Pharmacol Exp Ther* 329, 141-149

OWEN, A., M. PIRMOHAMED, J. N. TETTEY, P. MORGAN, D. CHADWICK u. B. K. PARK (2001): Carbamazepine is not a substrate for P-glycoprotein. *British journal of clinical pharmacology* 51, 345-349

PAN, W., C. YU, H. HSUCHOU u. A. J. KASTIN (2010): The role of cerebral vascular NFkappaB in LPS-induced inflammation: differential regulation of efflux transporter and transporting cytokine receptors. *Cell Physiol Biochem* 25, 623-630

PARDRIDGE, W. M. (2005): Molecular biology of the blood-brain barrier. *Mol Biotechnol* 30, 57-70

PARTON, R. G. (1996): Caveolae and caveolins. *Current opinion in cell biology* 8, 542-548

PAVLOVSKY, L., E. SEIFFERT, U. HEINEMANN, A. KORN, H. GOLAN u. A. FRIEDMAN (2005): Persistent BBB disruption may underlie alpha interferon-induced seizures. *J Neurol* 252, 42-46

PEKCEC, A., B. UNKRUEER, J. SCHLICHTIGER, J. SOERENSEN, A. M. HARTZ, B. BAUER, E. A. VAN VLIET, J. A. GORTER u. H. POTSCHKA (2009a): Targeting prostaglandin E2 EP1 receptors prevents seizure-associated P-glycoprotein up-regulation. *J Pharmacol Exp Ther* 330, 939-947

PEKCEC, A., B. UNKRUEER, V. STEIN, J. P. BANKSTAHL, J. SOERENSEN, A. TIPOLD, W. BAUMGARTNER u. H. POTSCHKA (2009b): Over-expression of P-glycoprotein in the canine brain following spontaneous status epilepticus. *Epilepsy research* 83, 144-151

PICK, A., H. MULLER u. M. WIESE (2008): Structure-activity relationships of new inhibitors of breast cancer resistance protein (ABCG2). *Bioorg Med Chem* 16, 8224-8236

PIN, A. L., F. HOULE, P. FOURNIER, M. GUILLONNEAU, E. R. PAQUET, M. J. SIMARD, I. ROYAL u. J. HUOT (2012): Annexin-1-mediated endothelial cell migration and angiogenesis are regulated by vascular endothelial growth factor (VEGF)-induced inhibition of miR-196a expression. *The Journal of biological chemistry* 287, 30541-30551

PITKANEN, A. (2010): Therapeutic approaches to epileptogenesis--hope on the horizon. *Epilepsia* 51 Suppl 3, 2-17

PITKANEN, A. u. K. LUKASIUK (2009): Molecular and cellular basis of epileptogenesis in symptomatic epilepsy. *Epilepsy Behav* 14 Suppl 1, 16-25

- PITKANEN, A. u. T. P. SUTULA (2002): Is epilepsy a progressive disorder? Prospects for new therapeutic approaches in temporal-lobe epilepsy. *The Lancet. Neurology* 1, 173-181
- PODELL, M., W. R. FENNER u. J. D. POWERS (1995): Seizure classification in dogs from a nonreferral-based population. *J Am Vet Med Assoc* 206, 1721-1728
- POTSCHKA, H. (2010a): Targeting regulation of ABC efflux transporters in brain diseases: a novel therapeutic approach. *Pharmacol Ther* 125, 118-127
- POTSCHKA, H. (2010b): Transporter hypothesis of drug-resistant epilepsy: challenges for pharmacogenetic approaches. *Pharmacogenomics* 11, 1427-1438
- POTSCHKA, H. (2010c): Transporterhypothese der Pharmakoresistenz von Epilepsien. *Zeitschrift für Epileptologie* 23, 152-160
- POTSCHKA, H., M. FEDROWITZ u. W. LOSCHER (2001): P-glycoprotein and multidrug resistance-associated protein are involved in the regulation of extracellular levels of the major antiepileptic drug carbamazepine in the brain. *Neuroreport* 12, 3557-3560
- POTSCHKA, H., M. FEDROWITZ u. W. LOSCHER (2002): P-Glycoprotein-mediated efflux of phenobarbital, lamotrigine, and felbamate at the blood-brain barrier: evidence from microdialysis experiments in rats. *Neurosci Lett* 327, 173-176
- POTSCHKA, H., A. FISCHER, W. LOSCHER, N. PATTERSON, S. BHATTI, M. BERENDT, L. DE RISIO, R. FARQUHAR, S. LONG, P. MANDIGERS, K. MATIASEK, K. MUNANA, A. PAKOZDY, J. PENDERIS, S. PLATT, M. PODELL, C. RUSBRIDGE, V. STEIN, A. TIPOLD u. H. A. VOLK (2015): International veterinary epilepsy task force consensus proposal: outcome of therapeutic interventions in canine and feline epilepsy. *BMC veterinary research* 11, 177
- POTSCHKA, H., A. FISCHER, E. L. RÜDEN, V. HÜLSMEYER u. W. BAUMGÄRTNER (2013): Canine epilepsy as a translational model? *Epilepsia* 54, 571-579
- POTSCHKA, H. u. W. LOSCHER (2001): In vivo evidence for P-glycoprotein-mediated transport of phenytoin at the blood-brain barrier of rats. *Epilepsia* 42, 1231-1240
- POTSCHKA, H. u. H. LUNA-MUNGUÍA (2014): CNS transporters and drug delivery in epilepsy. *Curr Pharm Des* 20, 1534-1542
- POTSCHKA, H., H. A. VOLK u. W. LOSCHER (2004): Pharmacoresistance and expression of multidrug transporter P-glycoprotein in kindled rats. *Neuroreport* 15, 1657-1661
- RADISCH, S., D. DICKENS, T. LANG, L. BONNETT, R. ARLANOV, M. R. JOHNSON, M. SCHWAB, A. G. MARSON u. M. PIRMOHAMED (2014): A comprehensive functional and clinical analysis of ABCC2 and its impact on treatment response to carbamazepine. *Pharmacogenomics J* 14, 481-487
- RAKHADE, S. N. u. F. E. JENSEN (2009): Epileptogenesis in the immature brain: emerging mechanisms. *Nat Rev Neurol* 5, 380-391

- RAMBECK, B., U. H. JURGENS, T. W. MAY, H. W. PANNEK, F. BEHNE, A. EBNER, A. GORJI, H. STRAUB, E. J. SPECKMANN, B. POHLMANN-EDEN u. W. LOSCHER (2006): Comparison of brain extracellular fluid, brain tissue, cerebrospinal fluid, and serum concentrations of antiepileptic drugs measured intraoperatively in patients with intractable epilepsy. *Epilepsia* 47, 681-694
- RAPOPORT, S. I. (2001): Advances in osmotic opening of the blood-brain barrier to enhance CNS chemotherapy. Expert opinion on investigational drugs 10, 1809-1818
- REGESTA, G. u. P. TANGANELLI (1999): Clinical aspects and biological bases of drug-resistant epilepsies. *Epilepsy research* 34, 109-122
- REMY, S. u. H. BECK (2006): Molecular and cellular mechanisms of pharmacoresistance in epilepsy. *Brain* 129, 18-35
- REMY, S., S. GABRIEL, B. W. URBAN, D. DIETRICH, T. N. LEHMANN, C. E. ELGER, U. HEINEMANN u. H. BECK (2003): A novel mechanism underlying drug resistance in chronic epilepsy. *Ann Neurol* 53, 469-479
- RIBAS, C., P. PENELA, C. MURGA, A. SALCEDO, C. GARCIA-HOZ, M. JURADO-PUEYO, I. AYMERICH u. F. MAYOR, JR. (2007): The G protein-coupled receptor kinase (GRK) interactome: role of GRKs in GPCR regulation and signaling. *Biochim Biophys Acta* 1768, 913-922
- RIGAU, V., M. MORIN, M.-C. ROUSSET, F. DE BOCK, A. LEBRUN, P. COUBES, M.-C. PICOT, M. BALDY-MOULINIER, J. BOCKAERT u. A. CRESPEL (2007): Angiogenesis is associated with blood-brain barrier permeability in temporal lobe epilepsy. *Brain* 130, 1942-1956
- RIVAS, V., R. CARMONA, R. MUÑOZ-CHÁPULI, M. MENDIOLA, L. NOGUÉS, C. REGLERO, M. MIGUEL-MARTÍN, R. GARCÍA-ESCUADERO, G. W. DORN, D. HARDISSON, F. MAYOR u. P. PENELA (2013): Developmental and tumoral vascularization is regulated by G protein-coupled receptor kinase 2. *The Journal of Clinical Investigation* 123, 4714-4730
- RIZZI, M., S. CACCIA, G. GUIZO, C. RICHICHI, J. A. GORTER, E. ARONICA, M. ALIPRANDI, R. BAGNATI, R. FANELLI, M. D'INCALCI, R. SAMANIN u. A. VEZZANI (2002): Limbic seizures induce P-glycoprotein in rodent brain: functional implications for pharmacoresistance. *J Neurosci* 22, 5833-5839
- ROCHA, L. u. E. A. CAVALHEIRO (2014): Pharmacoresistance in Epilepsy: From Genes and Molecules to Promising Therapies. Springer Science & Business Media,
- ROGAWSKI, M. A. u. M. R. JOHNSON (2008): Intrinsic severity as a determinant of antiepileptic drug refractoriness. *Epilepsy Curr* 8, 127-130
- ROGAWSKI, M. A. u. W. LOSCHER (2004): The neurobiology of antiepileptic drugs for the treatment of nonepileptic conditions. *Nature medicine* 10, 685-692
- ROGAWSKI, M. A. u. W. LÖSCHER (2004): The neurobiology of antiepileptic drugs. *Nature Reviews Neuroscience* 5, 553-564

ROMERMANN, K., R. HELMER u. W. LOSCHER (2015): The antiepileptic drug lamotrigine is a substrate of mouse and human breast cancer resistance protein (ABCG2). *Neuropharmacology* 93, 7-14

RONDOUIN, G., J. BOCKAERT u. M. LERNER-NATOLI (1993): L-nitroarginine, an inhibitor of NO synthase, dramatically worsens limbic epilepsy in rats. *Neuroreport* 4, 1187-1190

RUNDFELDT, C., A. GASPARIC u. P. WLAŹ (2014): Imepitoin as novel treatment option for canine idiopathic epilepsy: pharmacokinetics, distribution, and metabolism in dogs. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics* 37, 421-434

RUNDFELDT, C. u. W. LOSCHER (2014): The pharmacology of imepitoin: the first partial benzodiazepine receptor agonist developed for the treatment of epilepsy. *CNS Drugs* 28, 29-43

RUNDHAUG, J. E. (2005): Matrix metalloproteinases and angiogenesis. *J Cell Mol Med* 9, 267-285

SAHARINEN, P. u. J. IVASKA (2015): Blocking integrin inactivation as an anti-angiogenic therapy. *The EMBO journal* 34, 1293-1295

SAINO, M., T. MARUYAMA, T. SEKIYA, T. KAYAMA u. Y. MURAKAMI (2004): Inhibition of angiogenesis in human glioma cell lines by antisense RNA from the soluble guanylate cyclase genes, GUCY1A3 and GUCY1B3. *Oncol Rep* 12, 47-52

SALKOFF, L., A. BUTLER, G. FERREIRA, C. SANTI u. A. WEI (2006): High-conductance potassium channels of the SLO family. *Nature reviews. Neuroscience* 7, 921-931

SALVAMOSER, J. D., J. AVEMARY, H. LUNA-MUNGUÍA, B. PASCHER, T. GETZINGER, T. PIEPER, M. KUDERNATSCH, G. KLUGER u. H. POTSCHKA (2015): Glutamate-Mediated Down-Regulation of the Multidrug-Resistance Protein BCRP/ABCG2 in Porcine and Human Brain Capillaries. *Mol Pharm* 12, 2049-2060

SANDER, J. W. u. S. D. SHORVON (1996): Epidemiology of the epilepsies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 61, 433-443

SATO, N., N. FUNAYAMA, A. NAGAFUCHI, S. YONEMURA, S. TSUKITA u. S. TSUKITA (1992): A gene family consisting of ezrin, radixin and moesin. Its specific localization at actin filament/plasma membrane association sites. *Journal of cell science* 103 (Pt 1), 131-143

SCHARFMAN, H. E. (2005): Growth factors and epilepsy. Nova Publishers,

SCHARFMAN, H. E. (2007): The neurobiology of epilepsy. *Curr Neurol Neurosci Rep* 7, 348-354

SCHEFFZEK, K. u. M. R. AHMADIAN (2005): GTPase activating proteins: structural and functional insights 18 years after discovery. *Cell Mol Life Sci* 62, 3014-3038

SCHELLER, N., P. RESA-INFANTE, S. DE LA LUNA, R. P. GALAO, M. ALBRECHT, L. KAESTNER, P. LIPP, T. LENG AUER, A. MEYERHANS u. J. DIEZ (2007): Identification

of PatL1, a human homolog to yeast P body component Pat1. *Biochim Biophys Acta* 1773, 1786-1792

SCHERER, P. E., Z. TANG, M. CHUN, M. SARGIACOMO, H. F. LODISH u. M. P. LISANTI (1995): Caveolin isoforms differ in their N-terminal protein sequence and subcellular distribution. Identification and epitope mapping of an isoform-specific monoclonal antibody probe. *The Journal of biological chemistry* 270, 16395-16401

SCHINKEL, A. H. (1999): P-glycoprotein, a gatekeeper in the blood–brain barrier. *Advanced drug delivery reviews* 36, 179-194

SCHINKEL, A. H. u. J. W. JONKER (2003): Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview. *Advanced Drug Delivery Reviews* 55, 3-29

SCHINKEL, A. H., J. J. SMIT, O. VAN TELLINGEN, J. H. BEIJNEN, E. WAGENAAR, L. VAN DEEMTER, C. A. MOL, M. A. VAN DER VALK, E. C. ROBANUS-MAANDAG, H. P. TE RIELE u. ET AL. (1994): Disruption of the mouse *mdr1a* P-glycoprotein gene leads to a deficiency in the blood-brain barrier and to increased sensitivity to drugs. *Cell* 77, 491-502

SCHLICHTIGER, J., A. PEKCEC, H. BARTMANN, P. WINTER, C. FUEST, J. SOERENSEN u. H. POTSCHKA (2010): Celecoxib treatment restores pharmacosensitivity in a rat model of pharmaco-resistant epilepsy. *Br J Pharmacol* 160, 1062-1071

SCHMIDT, A., I. FORNE u. A. IMHOF (2014): Bioinformatic analysis of proteomics data. *BMC Syst Biol* 8 Suppl 2, S3

SCHMIDT, D. u. C. E. ELGER (2004): Worin unterscheidet sich Oxcarbazepin von Carbamazepin? *Der Nervenarzt* 75, 153-160

SCHMIDT, D. u. W. LOSCHER (2005): Drug resistance in epilepsy: putative neurobiologic and clinical mechanisms. *Epilepsia* 46, 858-877

SCHNEBLE, H. (2003): Heillos, heilig, heilbar: die Geschichte der Epilepsie von den Anfängen bis heute. Walter de Gruyter,

SCHWARTZ-PORSCHKE, D., W. LOSCHER u. H. H. FREY (1985): Therapeutic efficacy of phenobarbital and primidone in canine epilepsy: a comparison. *J Vet Pharmacol Ther* 8, 113-119

SEEGERS, U., H. POTSCHKA u. W. LOSCHER (2002a): Expression of the multidrug transporter P-glycoprotein in brain capillary endothelial cells and brain parenchyma of amygdala-kindled rats. *Epilepsia* 43, 675-684

SEEGERS, U., H. POTSCHKA u. W. LOSCHER (2002b): Lack of effects of prolonged treatment with phenobarbital or phenytoin on the expression of P-glycoprotein in various rat brain regions. *Eur J Pharmacol* 451, 149-155

SEEGERS, U., H. POTSCHKA u. W. LOSCHER (2002c): Transient increase of P-glycoprotein expression in endothelium and parenchyma of limbic brain regions in the kainate model of temporal lobe epilepsy. *Epilepsy research* 51, 257-268

SEELBACH, M. J., T. A. BROOKS, R. D. EGLETON u. T. P. DAVIS (2007): Peripheral

inflammatory hyperalgesia modulates morphine delivery to the brain: a role for P-glycoprotein. *J Neurochem* 102, 1677-1690

SEIFFERT, E., J. P. DREIER, S. IVENS, I. BECHMANN, O. TOMKINS, U. HEINEMANN u. A. FRIEDMAN (2004): Lasting blood-brain barrier disruption induces epileptic focus in the rat somatosensory cortex. *J Neurosci* 24, 7829-7836

SHARMA, M. C. u. M. SHARMA (2007): The role of annexin II in angiogenesis and tumor progression: a potential therapeutic target. *Curr Pharm Des* 13, 3568-3575

SHAROM, F. J. (2014): Complex Interplay between the P-Glycoprotein Multidrug Efflux Pump and the Membrane: Its Role in Modulating Protein Function. *Frontiers in oncology* 4, 41

SHI, S. R., M. E. KEY u. K. L. KALRA (1991): Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 39, 741-748

SHI, S. R., Y. SHI u. C. R. TAYLOR (2011): Antigen retrieval immunohistochemistry: review and future prospects in research and diagnosis over two decades. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 59, 13-32

SHORVON, S. (1990): Epidemiology, classification, natural history, and genetics of epilepsy. *The Lancet* 336, 93-96

SILLS, G. J., P. KWAN, E. BUTLER, E. C. DE LANGE, D. J. VAN DEN BERG u. M. J. BRODIE (2002): P-glycoprotein-mediated efflux of antiepileptic drugs: preliminary studies in *mdr1a* knockout mice. *Epilepsy Behav* 3, 427-432

SISODIYA, S. M. (2003): Mechanisms of antiepileptic drug resistance. *Curr Opin Neurol* 16, 197-201

SISODIYA, S. M., J. HEFFERNAN u. M. V. SQUIER (1999): Over-expression of P-glycoprotein in malformations of cortical development. *Neuroreport* 10, 3437-3441

SISODIYA, S. M., W. R. LIN, B. N. HARDING, M. V. SQUIER u. M. THOM (2002): Drug resistance in epilepsy: expression of drug resistance proteins in common causes of refractory epilepsy. *Brain* 125, 22-31

SMITH BAILEY, K. u. C. W. DEWEY (2009): The seizing cat. Diagnostic work-up and therapy. *Journal of feline medicine and surgery* 11, 385-394

SOMSEL RODMAN, J. u. A. WANDINGER-NESS (2000): Rab GTPases coordinate endocytosis. *Journal of cell science* 113 Pt 2, 183-192

SORIANO, J. V., N. LIU, Y. GAO, Z. J. YAO, T. ISHIBASHI, C. UNDERHILL, T. R. BURKE, JR. u. D. P. BOTTARO (2004): Inhibition of angiogenesis by growth factor receptor bound protein 2-*Src* homology 2 domain bound antagonists. *Mol Cancer Ther* 3, 1289-1299

STEVENSON, B. R., J. D. SILICIANO, M. S. MOOSEKER u. D. A. GOODENOUGH

(1986): Identification of ZO-1: a high molecular weight polypeptide associated with the tight junction (zonula occludens) in a variety of epithelia. *J Cell Biol* 103, 755-766

STOLETOV, K. V., C. GONG u. B. I. TERMAN (2004): Nck and Crk mediate distinct VEGF-induced signaling pathways that serve overlapping functions in focal adhesion turnover and integrin activation. *Exp Cell Res* 295, 258-268

SUGAWARA, I., I. KATAOKA, Y. MORISHITA, H. HAMADA, T. TSURUO, S. ITOYAMA u. S. MORI (1988): Tissue distribution of P-glycoprotein encoded by a multidrug-resistant gene as revealed by a monoclonal antibody, MRK 16. *Cancer research* 48, 1926-1929

SUN, H., H. DAI, N. SHAIK u. W. F. ELMQUIST (2003): Drug efflux transporters in the CNS. *Adv Drug Deliv Rev* 55, 83-105

SZETO, H. H. (2008): Development of mitochondria-targeted aromatic-cationic peptides for neurodegenerative diseases. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1147, 112-121

TAHIR, S. A., S. PARK u. T. C. THOMPSON (2009): Caveolin-1 regulates VEGF-stimulated angiogenic activities in prostate cancer and endothelial cells. *Cancer biology & therapy* 8, 2286-2296

TAKETANI, S., K. KAKIMOTO, H. UETA, R. MASAKI u. T. FURUKAWA (2003): Involvement of ABC7 in the biosynthesis of heme in erythroid cells: interaction of ABC7 with ferrochelatase. *Blood* 101, 3274-3280

TAMMELA, T., G. ZARKADA, E. WALLGARD, A. MURTOMAKI, S. SUCHTING, M. WIRZENIUS, M. WALTARI, M. HELLSTROM, T. SCHOMBER, R. PELTONEN, C. FREITAS, A. DUARTE, H. ISONIEMI, P. LAAKKONEN, G. CHRISTOFORI, S. YLAHERTTUALA, M. SHIBUYA, B. PYTOWSKI, A. EICHMANN, C. BETSHOLTZ u. K. ALITALO (2008): Blocking VEGFR-3 suppresses angiogenic sprouting and vascular network formation. *Nature* 454, 656-660

TAN, K. H., W. M. PURCELL, S. J. HEALES, J. D. MCLEOD u. R. D. HURST (2002): Evaluation of the role of P-glycoprotein in inflammation induced blood-brain barrier damage. *Neuroreport* 13, 2593-2597

TARI, A. M. u. G. LOPEZ-BERESTEIN (2001): GRB2: a pivotal protein in signal transduction. *Semin Oncol* 28, 142-147

TEIFEL, M. u. P. FRIEDL (1996): Establishment of the permanent microvascular endothelial cell line PBMEC/C1-2 from porcine brains. *Exp Cell Res* 228, 50-57

TERASAKI, T., Y. DEGUCHI, H. SATO, K. HIRAI u. A. TSUJI (1991): In vivo transport of a dynorphin-like analgesic peptide, E-2078, through the blood-brain barrier: an application of brain microdialysis. *Pharm Res* 8, 815-820

THERON, D., S. BARRAUD DE LAGERIE, S. TARDIVEL, H. PELERIN, P. DEMEUSE, C. MERCIER, A. MABONDZO, R. FARINOTTI, B. LACOUR, F. ROUX u. F. GIMENEZ (2003): Influence of tumor necrosis factor-alpha on the expression and function of P-glycoprotein in an immortalised rat brain capillary endothelial cell line, GPNT. *Biochem*

Pharmacol 66, 579-587

THIEBAUT, F., T. TSURUO, H. HAMADA, M. M. GOTTESMAN, I. PASTAN u. M. C. WILLINGHAM (1987): Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 7735-7738

THIEMAN, W. J., M. A. PALLADINO u. N. W. HOPF (2007): *Biotechnologie*. Pearson Deutschland GmbH,

THOMAS, H. u. H. M. COLEY (2003): Overcoming multidrug resistance in cancer: an update on the clinical strategy of inhibiting p-glycoprotein. *Cancer Control* 10, 159-165

TISHLER, D. M., K. I. WEINBERG, D. R. HINTON, N. BARBARO, G. M. ANNETT u. C. RAFFEL (1995): MDR1 gene expression in brain of patients with medically intractable epilepsy. *Epilepsia* 36, 1-6

TOMKINS, O., A. FEINTUCH, M. BENIFLA, A. COHEN, A. FRIEDMAN u. I. SHELEF (2011): Blood-brain barrier breakdown following traumatic brain injury: a possible role in posttraumatic epilepsy. *Cardiovasc Psychiatry Neurol* 2011, 765923

TOMKINS, O., O. FRIEDMAN, S. IVENS, C. REIFFURTH, S. MAJOR, J. P. DREIER, U. HEINEMANN u. A. FRIEDMAN (2007): Blood-brain barrier disruption results in delayed functional and structural alterations in the rat neocortex. *Neurobiol Dis* 25, 367-377

TOMKINS, O., I. SHELEF, I. KAIZERMAN, A. ELIUSHIN, Z. AFAWI, A. MISK, M. GIDON, A. COHEN, D. ZUMSTEG u. A. FRIEDMAN (2008): Blood-brain barrier disruption in post-traumatic epilepsy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 79, 774-777

TYERS, M. u. M. MANN (2003): From genomics to proteomics. *Nature* 422, 193-197

UCHIDA, Y., S. OHTSUKI, Y. KATSUKURA, C. IKEDA, T. SUZUKI, J. KAMIIE u. T. TERASAKI (2011): Quantitative targeted absolute proteomics of human blood-brain barrier transporters and receptors. *Journal of neurochemistry* 117, 333-345

VALDEHITA, A., M. J. CARMENA, B. COLLADO, J. C. PRIETO u. A. M. BAJO (2007): Vasoactive intestinal peptide (VIP) increases vascular endothelial growth factor (VEGF) expression and secretion in human breast cancer cells. *Regul Pept* 144, 101-108

VAN DAM, E. M. u. P. J. ROBINSON (2006): Ral: mediator of membrane trafficking. *The international journal of biochemistry & cell biology* 38, 1841-1847

VAN VLIET, E., E. ARONICA, S. REDEKER, N. MARCHI, M. RIZZI, A. VEZZANI u. J. GORTER (2004): Selective and persistent upregulation of *mdr1b* mRNA and P-glycoprotein in the parahippocampal cortex of chronic epileptic rats. *Epilepsy research* 60, 203-213

VAN VLIET, E. A., S. DA COSTA ARAUJO, S. REDEKER, R. VAN SCHAIK, E. ARONICA u. J. A. GORTER (2007a): Blood-brain barrier leakage may lead to progression of temporal lobe epilepsy. *Brain* 130, 521-534

VAN VLIET, E. A., S. REDEKER, E. ARONICA, P. M. EDELBROEK u. J. A. GORTER (2005): Expression of multidrug transporters MRP1, MRP2, and BCRP shortly after status epilepticus, during the latent period, and in chronic epileptic rats. *Epilepsia* 46, 1569-1580

- VAN VLIET, E. A., R. VAN SCHAIK, P. EDELBROEK, R. VOSKUYL, S. REDEKER, E. ARONICA, W. WADMAN u. J. GORTER (2007b): Region-specific overexpression of P-glycoprotein at the blood-brain barrier affects brain uptake of phenytoin in epileptic rats. *J Pharmacol Exp Ther* 322, 141-147
- VAN VLIET, E. A., R. VAN SCHAIK, P. M. EDELBROEK, S. REDEKER, E. ARONICA, W. J. WADMAN, N. MARCHI, A. VEZZANI u. J. A. GORTER (2006): Inhibition of the Multidrug Transporter P-Glycoprotein Improves Seizure Control in Phenytoin-treated Chronic Epileptic Rats. *Epilepsia* 47, 672-680
- VEZZANI, A. u. T. GRANATA (2005): Brain inflammation in epilepsy: experimental and clinical evidence. *Epilepsia* 46, 1724-1743
- VITORINO, P., S. YEUNG, A. CROW, J. BAKKE, T. SMYCZEK, K. WEST, E. MCNAMARA, J. EASTHAM-ANDERSON, S. GOULD u. S. F. HARRIS (2015): MAP4K4 regulates integrin-FERM binding to control endothelial cell motility. *Nature* 519, 425-430
- VOLK, H. u. S. LODERSTEDT (2011): Neuigkeiten in der Behandlung von Epilepsie bei Hund und Katze. *Kleintierpraxis* 16, 649-664
- VOLK, H., H. POTSCHKA u. W. LOSCHER (2005): Immunohistochemical localization of P-glycoprotein in rat brain and detection of its increased expression by seizures are sensitive to fixation and staining variables. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 53, 517-531
- VOLK, H. A. u. W. LOSCHER (2005): Multidrug resistance in epilepsy: rats with drug-resistant seizures exhibit enhanced brain expression of P-glycoprotein compared with rats with drug-responsive seizures. *Brain* 128, 1358-1368
- VON WEDEL-PARLOW, M., P. WOLTE u. H. J. GALLA (2009): Regulation of major efflux transporters under inflammatory conditions at the blood-brain barrier in vitro. *Journal of neurochemistry* 111, 111-118
- VREUGDENHIL, M., C. W. VAN VEELLEN, P. C. VAN RIJEN, F. H. LOPES DA SILVA u. W. J. WADMAN (1998): Effect of valproic acid on sodium currents in cortical neurons from patients with pharmaco-resistant temporal lobe epilepsy. *Epilepsy research* 32, 309-320
- WALKER, A. G. (2016): Differentielle Proteomanalyse in einem Modell der Epileptogenese: Regulation inflammations-assoziiierter Proteine
- WANDEL, C., R. B. KIM, S. KAJIJI, P. GUENGERICH, G. R. WILKINSON u. A. J. WOOD (1999): P-glycoprotein and cytochrome P-450 3A inhibition: dissociation of inhibitory potencies. *Cancer research* 59, 3944-3948
- WANG, P., Y. LUO, H. DUAN, S. XING, J. ZHANG, D. LU, J. FENG, D. YANG, L. SONG u. X. YAN (2013): MicroRNA 329 suppresses angiogenesis by targeting CD146. *Mol Cell Biol* 33, 3689-3699
- WANG, W., C. J. SOROKA, A. MENNONE, C. RAHNER, K. HARRY, M. PYPAERT u. J. L. BOYER (2006): Radixin is required to maintain apical canalicular membrane structure and

function in rat hepatocytes. *Gastroenterology* 131, 878-884

WANG, X., D. B. SYKES u. D. S. MILLER (2010): Constitutive androstane receptor-mediated up-regulation of ATP-driven xenobiotic efflux transporters at the blood-brain barrier. *Molecular pharmacology* 78, 376-383

WANG, Z. u. X. YAN (2013): CD146, a multi-functional molecule beyond adhesion. *Cancer Lett* 330, 150-162

WARY, K. K. u. J. O. HUMTSOE (2005): Anti-lipid phosphate phosphohydrolase-3 (LPP3) antibody inhibits bFGF- and VEGF-induced capillary morphogenesis of endothelial cells. *Cell Commun Signal* 3, 9

WEISS, J., C. J. KERPEN, H. LINDENMAIER, S. M. DORMANN u. W. E. HAEFELI (2003): Interaction of antiepileptic drugs with human P-glycoprotein in vitro. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 307, 262-267

WEN, T., Y. C. LIU, H. W. YANG, H. Y. LIU, X. D. LIU, G. J. WANG u. L. XIE (2008): Effect of 21-day exposure of phenobarbital, carbamazepine and phenytoin on P-glycoprotein expression and activity in the rat brain. *J Neurol Sci* 270, 99-106

WEST, C. L. u. K. L. MEALEY (2007): Assessment of antiepileptic drugs as substrates for canine P-glycoprotein. *American journal of veterinary research* 68, 1106-1110

WILKINS, M. R., C. PASQUALI, R. D. APPEL, K. OU, O. GOLAZ, J. C. SANCHEZ, J. X. YAN, A. A. GOOLEY, G. HUGHES, I. HUMPHERY-SMITH, K. L. WILLIAMS u. D. F. HOCHSTRASSER (1996): From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. *Biotechnology (N Y)* 14, 61-65

WISNIEWSKI, J. R., A. ZOUGMAN u. M. MANN (2009): Combination of FASP and StageTip-based fractionation allows in-depth analysis of the hippocampal membrane proteome. *Journal of proteome research* 8, 5674-5678

WOLBURG, H., S. NOELL, A. MACK, K. WOLBURG-BUCHHOLZ u. P. FALLIER-BECKER (2009): Brain endothelial cells and the glio-vascular complex. *Cell Tissue Res* 335, 75-96

WU, J., H. JI, Y. Y. WANG, Y. WANG, Y. Q. LI, W. G. LI, Y. LONG, Y. Z. XIA u. H. HONG (2009): Glutathione depletion upregulates P-glycoprotein expression at the blood-brain barrier in rats. *J Pharm Pharmacol* 61, 819-824

XU, W., L. Z. LIU, M. LOIZIDOU, M. AHMED u. I. G. CHARLES (2002): The role of nitric oxide in cancer. *Cell Res* 12, 311-320

XU, Z., N. JOSHI, A. AGARWAL, S. DAHIYA, P. BITTNER, E. SMITH, S. TAYLOR, D. PIWNICA-WORMS, J. WEBER u. J. R. LEONARD (2012): Knocking down nucleolin expression in gliomas inhibits tumor growth and induces cell cycle arrest. *Journal of neuro-oncology* 108, 59-67

YAFFE, K., D. FERRIERO, A. J. BARKOVICH u. H. ROWLEY (1995): Reversible MRI abnormalities following seizures. *Neurology* 45, 104-108

YANG, Q., R. ONUKI, C. NAKAI u. Y. SUGIYAMA (2007): Ezrin and radixin both regulate the apical membrane localization of ABCC2 (MRP2) in human intestinal epithelial Caco-2 cells. *Experimental cell research* 313, 3517-3525

YANG, W. J., Y. N. YANG, J. CAO, Z. H. MAN, Y. LI u. Y. Q. XING (2015): Paxillin regulates vascular endothelial growth factor A-induced in vitro angiogenesis of human umbilical vein endothelial cells. *Mol Med Rep* 11, 1784-1792

YANG, Z. H. u. X. D. LIU (2008): P-glycoprotein-mediated efflux of phenobarbital at the blood-brain barrier evidence from transport experiments in vitro. *Epilepsy Res* 78, 40-49

YANO, K., T. TOMONO, R. SAKAI, T. KANO, K. MORIMOTO, Y. KATO u. T. OGIHARA (2013a): Contribution of radixin to P-glycoprotein expression and transport activity in mouse small intestine in vivo. *J Pharm Sci* 102, 2875-2881

YANO, K., T. TOMONO, R. SAKAI, T. KANO, K. MORIMOTO, Y. KATO u. T. OGIHARA (2013b): Contribution of radixin to P-glycoprotein expression and transport activity in mouse small intestine in vivo. *Journal of pharmaceutical sciences* 102, 2875-2881

YEUNG, D., J. L. MANIAS, D. J. STEWART u. S. NAG (2008): Decreased junctional adhesion molecule-A expression during blood-brain barrier breakdown. *Acta Neuropathol* 115, 635-642

YI, M. u. J. E. SCHNITZER (2009): Impaired tumor growth, metastasis, angiogenesis and wound healing in annexin A1-null mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 17886-17891

YU, C., G. ARGYROPOULOS, Y. ZHANG, A. J. KASTIN, H. HSUCHOU u. W. PAN (2008): Neuroinflammation activates Mdr1b efflux transport through NFkappaB: promoter analysis in BBB endothelia. *Cell Physiol Biochem* 22, 745-756

ZABEL, U., M. WEEGER, M. LA u. H. H. SCHMIDT (1998): Human soluble guanylate cyclase: functional expression and revised isoenzyme family. *Biochem J* 335 (Pt 1), 51-57

ZHANG, C., P. KWAN, Z. ZUO u. L. BAUM (2010): In vitro concentration dependent transport of phenytoin and phenobarbital, but not ethosuximide, by human P-glycoprotein. *Life Sci* 86, 899-905

ZHANG, C., Z. ZUO, P. KWAN u. L. BAUM (2011): In vitro transport profile of carbamazepine, oxcarbazepine, eslicarbazepine acetate, and their active metabolites by human P-glycoprotein. *Epilepsia* 52, 1894-1904

ZHAO, S.-H., D.-Y. PAN, Y. ZHANG, J.-H. WU, X. LIU u. Y. XU (2010): Annexin A2 promotes choroidal neovascularization by increasing vascular endothelial growth factor expression in a rat model of argon laser coagulation-induced choroidal neovascularization. *Chinese medical journal* 123, 713-721

ZHU, H. J. u. G. Q. LIU (2004): Glutamate up-regulates P-glycoprotein expression in rat brain microvessel endothelial cells by an NMDA receptor-mediated mechanism. *Life Sci* 75, 1313-1322

ZIBELL, G., B. UNKRUER, A. PEKCEC, A. M. HARTZ, B. BAUER, D. S. MILLER u. H. POTSCHKA (2009): Prevention of seizure-induced up-regulation of endothelial P-glycoprotein by COX-2 inhibition. *Neuropharmacology* 56, 849-855

ZOU, X. u. X. RUAN (2000): The alterations in vasoactive intestinal polypeptide-immune reaction positive neurons of cerebral tissues in epileptic rats induced by penicillin. *Hua Xi Yi Ke Da Xue Xue Bao* 31, 325-327

X. ANHANG

1. Substanzen

Substanzen	Hersteller
Ammonium-Nickelsulfat-Hexahydrat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, Deutschland
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
BODIPY-Prazosin (BP)	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, Deutschland
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, Deutschland
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Honeywell Riedel-de Haën, Seelze, Deutschland
Carbamazepin (CBZ)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, Deutschland
Casein	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, Deutschland
CellLytic™ <i>Mammalian Tissue Lysis/Extraction Reagent</i>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, Deutschland
Ethylendiamintetraacetat freier Protease-Inhibitor Complete	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, Deutschland
p-Cumarsäure	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
D-Glukose	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Dextran <i>from Leuconostoc spp.</i>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, Deutschland
Diaminobenzidin (DAB)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, Deutschland
Dithiotreitol (DTT)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Eisessig	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Entellan	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ethanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Folin-Ciocalteus Phenolreagenz	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Fumitremorgin C (FTC)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, Deutschland
Glycerol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Glycin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Hämalaun	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
HEPES	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Kaliumchlorid (KCl)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Kaliumhydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, Deutschland
Kupfer-II-sulfat x 5 H ₂ O (CuSO ₄)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Luminol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, Deutschland
Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
<i>3-[[3-[2-(7-chloroquinolin-2-yl)vinyl]phenyl]- (2-dimethylcarbamoylethylsulfanyl)- methylsulfanyl] propionic acid (MK-571)</i>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, Deutschland
Natriumcarbonat (Na_2CO_3)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumcitrat Dihydrat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumkaliumtetrat (Seignettesalz)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumpyruvat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, Deutschland
<i>[N-(4-nitrobenzofurazan-7-yl)-D-Lys⁸]- cyclosporine A (NBD-CSA)</i>	Roland Wenger, Heidelberg, Deutschland
Phenobarbital (PB)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, Deutschland
Polyacrilamid 30 % (Rotiphorese® Gel 30)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Poly-L-Lysine	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Polyoxyethylen-Sorbitan-Monolaurat (Tween®20)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Protein Marker V <i>prestained</i>	peqlab, Erlangen, Deutschland
PSC-833	Tebu-bio GmbH, Offenbach, Deutschland
Roti®-Block proteinfrei	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

Salzsäure 32 % (HCl)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Serum (Ziege)	Vector Laboratories, inc., Burlingame, USA
<i>Sodium dodecyl sulfate</i> (SDS)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Streptavidin/Meerrettich-Peroxidase (HRP)	Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland
Texas Red (Sulforhodamine 101)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, Deutschland
Topiramat (TPM)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, Deutschland
TMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin, 1,2-Bis(dimethylamino)-ethan	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Tris-(hydroxymethyl)- Aminomethan (C ₄ H ₁₁ NO ₃)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Triton X	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
<i>Trypsin from bovine pankreas</i>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, Deutschland
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Xylol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

2. Antikörper

Bezeichnung	Firma
Anti- β -Aktin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, Deutschland
BXP-53	Enzo Life Sciences GmbH, Lörrach, Deutschland
C219	Enzo Life Sciences GmbH, Lörrach, Deutschland
C23 (MS-3)	Santa Cruz, USA
EPR7952	Abcam, Cambridge, England
HRP Esel anti-Ratte	Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland
HRP Ziege anti-Maus	Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland
Ziege anti-Kaninchen biotinyliert	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland

3. Lösungen und Puffer

3.1. Transport-Assay und Western Blot

Isolutionslösung

103 mM NaCl

4,7 mM KCl

1,2 mM KH_2PO_4

10 mM HEPES

1,2 mM $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$

2,5 mM $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$

pH 7,4

Isolutionslösung mit BSA

Isolutionslösung

25mM NaHCO_3

10 mM Glukose

1 mM Natriumpyruvate

0,5 % BSA

pH 7,4

CTC-Reagenz

0,1 % $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$

0,2 % Na-K-tatrat (Seignettesalz)

10 % Na_2CO_3

Lowry-Reagenz A

2 ml CTC-Reagenz

2 ml 0,8 M NaOH

4 ml 5 % SDS

Lowry-Reagenz B

1 ml Folin Reagenz

5 ml Aqua dest.

Probenpuffer 5-fach

200 mM Tris

10 % SDS

200 mM DTT

0,2 % Bromphenolblau

20 % Glycerol

25 % β -Mercaptoethanol

pH 6,8

Laufpuffer (10-fach)

25 mM Tris

192 mM Glycin

0,1 % SDS

Blotting-Buffer (10-fach)

25 mM Tris

96 mM Glycin

TBS/T

25 mM Tris

190 mM NaCl

0,1 % Tween 20

pH 7,7

Blocking-Lösung

5 % Milchpulver

TBS/T

ECL-Reagenz

2 ml Tris 1 M (pH 8,5)

89 μ l p-Cumarsäure

200 μ l Luminol

18 ml Aqua dest.

8 % Trenngel (für zwei Gele)

6,1 ml Aqua dest.

3,75 ml 1,5 M Tris (pH = 8,8)

100 µl 10 % SDS

4 ml PAA 30 %

15 µl TMED

75 µl 10 % APS

3,5 % Sammelgel (für zwei Gele)

7,1 ml Aqua dest.

1 ml 1,25 M Tris (pH = 6,8)

100 µl 10 % SDS

1,7 ml 30 %PAA

20 µl TMED

100 µl 10 % APS

3.2. ImmunhistochemieBlocking-Lösung

Carrier-Lösung

5,95 % Serum (Ziege)

2,95 % BSA

Carrier-Lösung

0,05 M TBS

1 % Serum (Ziege)

1 % BSA

0,3 % Triton X

Casein-Block (serumfrei)

0,05 M TBS

0,25 % Casein

0,05 M Tris

Diaminobenzidin (DAB)-Reaktionslösung

Tris-Nickel-Lösung

0,025 % DAB x 4 HCL

0,006 % H₂O₂

EDTA-Puffer

10 mM Tris

1 mM EDTA

0,5 % Tween 20

pH 9

Natrium-Citrat-Puffer

10 mM NaCitrat dihydrat

pH 6,0

primäres Antikörperserum

serumfreier Casein-Block

0,1 % Tween 20

anti-*nucleolin* 1:2000

Sekundäres Antikörperserum

serumfreier Casein-Block

biotinylierten Ziege anti-Kanninchen 1:500

Streptavidin/HRP-Komplex

1:1400 Streptavidin/ Meerrettich-Peroxidase

0,05 M TBS

TBS

0,05 M Tris

0,15 M NaCl

pH 7,6

TBS/ Tween20 (Waschpuffer)

0,05 M Tris

0,15 M NaCl

0,05 % Tween 20

pH 7,6

Tris-EDTA-Puffer

10 mM Tris

1 mM EDTA

0,05 % Tween 20

pH 9

Tris-Nickel-Lösung

0,05 M TBS

0,6 % Ammonium-Nickelsulfat

pH 7,6

Tris-Puffer

0,05 M Tris

0,15 M NaCl

0,05 % Tween 20

pH 7,6

Trypsinlösung

8 g NaCl

0,2 g KCl

0,2 g KH₂PO₄

1,15 g Na₂HPO₄

1,25 g EDTA

1,25 g Trypsin

Aqua dest. ad 1l

pH 7,4

Wasserstoffperoxidlösung30 % H₂O₂

0,05 M TBS

4. Geräte

Gerät	Bezeichnung/ Besonderheit	Hersteller
Anschlussgerät der Gelelektrophorese und des Blotters	Consort Power Supply(E831)	peqlab, Erlangen, Deutschland
Blotter		Interne Werkstatt, München, Deutschland
Chemolumineszenz-Kamera	Fusion Advanced FX7	peqlab, Erlangen, Deutschland
Digital Kamera des Konfokalen Mikroskops	Hitachi HV-C20A	Hitachi Denshi, Tokyo, Japan
Gelelektrophorese-kammer für SDS-Gelelektrophorese	Mini-Protean II	Bio-Rad <i>Laboratories</i> GmbH, München, Deutschland
Gelgießstand für SDS-Gel		Bio-Rad <i>Laboratories</i> GmbH, München, Deutschland
Glashomogenisator	40 ml-Gefäß	Fisher Scientific GmbH Schwerte, Deutschland
Glasperlen	3 mm Durchmesser	Hartenstein, Würzburg, Deutschland
Glaspistill	für 40 ml-Gefäß	Fisher Scientific GmbH Schwerte, Deutschland
Glassäule		TH. G
Kamera des Lichtmikroskops	Zeiss Axiocam MRc	Carl Zeiss, Jena, Deutschland
Konfokales Mikroskop	LSM 510	Carl Zeiss, Jena, Deutschland
Lichtmikroskop	Olympus BH-2	Olympus, Japan
Mikrowelle	Severin MW7803	SEVERIN Elektrogeräte GmbH, Sundern, Deutschland
Minihomogenisator		VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland

Nylonsieb	210 µm Maschenweite	Hartenstein, Würzburg, Deutschland
Nylonsieb	150 µm Maschenweite	Hartenstein, Würzburg, Deutschland
Objektträger	Superfrost Plus	Gerhard Menzel B.V. & Co. KG, Braunschweig, Deutschland
PVDF-Membran		peqlab, Erlangen, Deutschland
Rotationsmikrotom	1165/Rotocut	Reichert-Jung, Nußloch, Deutschland
Rüttler		IKA®-Werke GmbH & Co. KG Staufen, Deutschland
Spectrophotometer	Genesys 10S UV-Vis Spektrometer	ThermoScientific, Waltham, USA
Thermomixer	5436	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Vortexer	LMS® VTX-3000L Mixer UZUSIO	Hartenstein, Würzburg, Deutschland
Wasserbad	Typ 24900	Medax Nagel GmbH & Co. KG, Neumünster, Deutschland
Zentrifuge	RC 6 ⁺	Thermo Scientific Schwerte, Deutschland
Zentrifuge	Mikro 200	Hettich-Zentrifuge, Tuttingen, Deutschland
Zentrifuge	Sorvall RC M150 GX	ThermoScientific Schwerte, Deutschland
Zentrifugengefäße	50 ml, 250 ml	Thermo Fischer Scientific, Rochester, USA

5. Software

Software	Hersteller/URL
Bildanalysesoftware KS 400	Carl Zeiss, Microimaging GmbH, Göttingen, Deutschland
<i>ConsensusPathDB</i>	http://consensuspathdb.org/
Excel 2010	Microsoft, Redmond, WA, USA
<i>Graph Pad Prism 5.0</i>	GraphPad Software, Inc., La Jolla, USA
<i>Genomatix</i>	Genomatix Software GmbH, München, Deutschland
<i>Image J 1.4.3.67</i>	Launacher Symmetry Software, NIH, Bethesda, USA
PowerPoint 2010	Microsoft, Redmond, WA, USA
<i>Progenesis-Software</i>	Version 2,5, Nonliner Dynamics Limited, Newcastle upon Tyne, UK
Programmiersprache R	http://www.r-project.org/

6. R-Skript

Programmcode für die graphische Darstellung der individuellen Expression der Proteine mittels *Heatmaps*.

```
##### R-Paket(e) #####

library(gplots)

##### Einlesen und Bearbeiten der Daten #####

data <- read.csv("Dateipfad.csv")

options(OutDec=",") #Dezimaltrennzeichen=", "

#log2-Transformierung und Datenkonvertierung in ein Matrixformat
mat_data <- data.matrix(log2(data[,2:ncol(data)]))
rownames(mat_data) <- data[,1]

#Datenbearbeitung (Runden) für die nachfolgende Zellenbeschriftung
mat <- data.matrix(data[,2:ncol(data)])
mat <- ifelse(mat>0.05, round(mat, digits=1), round(mat, digits=2))

#Definierung der Farbskalierung für die Heatmap
my_palette <- colorRampPalette(c("red", "white", "blue")) (n=299)

##### Erstellung der Heatmap #####

heatmap.2(mat_data, cellnote=mat, notecol="black", notecex=0.68, scale="none",
key = FALSE, density.info="none", trace="none", margins=c(10,9),
col=my_palette, dendrogram="none", cexCol=1.0, cexRow=1.0,
colv=FALSE)
```

XI. DANKSAGUNG

Meinen größten Dank möchte ich Frau Prof. Dr. Heidrun Potschka aussprechen. Sie hat mir das notwendige Vertrauen entgegengebracht, um diese zwei Projekte unter ihrer überaus kompetenten Betreuung erfolgreich umzusetzen. Darüber hinaus bedanke ich mich bei ihr für die zahlreichen konstruktiven wissenschaftlichen Diskussionen, für die Anleitung zu korrektem wissenschaftlichen Arbeiten sowie für die fachkompetente Unterstützung bei der Anfertigung meiner Dissertation.

Dr. Lotta von Rüden danke ich besonders für die hervorragende Betreuung, die ideenreichen wissenschaftlichen Anregungen, ihre große Unterstützung bei der Umsetzung meines Projektes sowie für die Korrektur meiner Arbeit. Nicht weniger gilt mein besonderer Dank Josephine Salvamoser, die mich großartig betreut und mich mit viel Engagement fachlich und methodisch unterstützt hat.

Dr. Vera Russmann, Lucia Rettenbeck, Andreas Walker, Fabio Wolf, Michael Keck und Steve Chiumento möchte ich danken für die schöne und unvergessliche Zeit im Labor und im Doktorandenzimmer, die fachliche und tatkräftige Unterstützung bei der Umsetzung meiner Projekte sowie die anregenden Unterhaltungen. Sie alle haben maßgeblich dazu beigetragen, dass ich meine Doktorandenzeit in sehr guter Erinnerung behalten werde.

Ein großer Dank für die großartige technische Unterstützung, Einarbeitung sowie für die nette und freundliche Arbeitsatmosphäre gilt Angela Vicidomini, Barbara Kohler, Carmen Meyer, Claudia Siegl, Grazyna Langer, Marion Fisch, Isabella Waclawczyk, Olga Cabezas, Regina Rentsch, Sieglinde Fischlein, Tamara Lindemann, und Manfred Kutschka.

Bei Markus Pöllot und Markus Friedler vom Münchner Schlachthof bedanke ich mich ganz herzlich für die Bereitstellung der Schweinehirne. Die erfolgreiche Umsetzung meiner Studie wäre ohne ihr großes Engagement nicht möglich gewesen.

Schließlich möchte ich mich mit einem großen Dankeschön an meine liebe Familie richten. Vor allem danke ich meinen Eltern für ihre Liebe, ihren Rückhalt und ihre Unterstützung in allen meinen bisherigen Entscheidungen. Ich danke Ihnen für die bedingungslose Hilfe in jeder Lebenslage. Ohne ihre große Unterstützung und ihre tolerante Weitsicht wäre mein bisheriger Lebensweg in dieser Form nicht möglich gewesen. Bei Simon Acker möchte ich mich

ganz besonders bedanken. Er gibt mir mit seiner liebevollen und geduldigen Art in jeder Lebenslage Kraft und steht mir immer mit Rat und Tat beiseite. Ich bin sehr froh ihn an meiner Seite zu haben. Christa Acker und Reimund Acker danke ich für die zahlreichen stundenlangen, interessanten und konstruktiven Gespräche bei hervorragendem Essen und Trinken, aus denen ich immer gestärkt und mit viel Selbstvertrauen herausgehe.